

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DANIEL BARLETTA SULIS

SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS POTENCIALMENTE CAPAZES DE CONFERIR  
TOLERÂNCIA AO FRIO E/OU AO CONGELAMENTO EM PLANTAS

Porto Alegre

2015

DANIEL BARLETTA SULIS

SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS POTENCIALMENTE CAPAZES DE CONFERIR  
TOLERÂNCIA AO FRIO E/OU AO CONGELAMENTO 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 em Bacharel em  
Biotecnologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Gilberto Renato Sulis e Anete Barletta Sulis, pelo apoio incondicional nestes quatro anos de graduação. Com certeza, vocês têm uma participação fundamental nesta minha trajetória da graduação.

Não menos importante durante esta árdua trajetória, gostaria de agradecer minha namorada Bárbara Machado Marques por todo amor, carinho, companheirismo e, principalmente, muita paciência nesta época de trabalho de conclusão. Jamais esquecerei toda a tua ajuda. Não há palavras para dimensionar toda a importância que tu tiveste durante todo este tempo.

Ao meu irmão Matheus Barletta Sulis. Apesar das frequentes brigas entre irmãos, sempre foi o meu grande parceiro para tudo.

Ao meu orientador Giancarlo Pasquali, por todos os seus ensinamentos durante estes quase dois anos e meio em seu laboratório.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório, obrigado pela convivência e risadas.

Aos meus amigos da biotecnologia: Jonata; Magnus; Mateus; Rodolfo; Thomaz. Obrigado pela grande força, parceria e conversas ao longo da graduação.

## RESUMO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e é composto em sua maioria por arbóreas florestais. Entre as principais espécies deste gênero, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. globulus* e híbridos destes apresentam destaque na produção de papel e pastas de celulose. Entretanto, as baixas temperaturas registradas no inverno da região sul do Brasil e a ausência de tolerância ao frio e/ou ao congelamento na maioria das espécies de *Eucalyptus* limitam o crescimento e o desenvolvimento de plantas deste gênero. O desenvolvimento de linhagens híbridas como *E. globulus* x *E. urophylla*, combinando espécies de clima temperado e de clima tropical, tem resultado em sucesso no plantio de *Eucalyptus* em regiões subtropicais. Contudo, as baixas temperaturas e as geadas recorrentes continuam a causar severos danos nas árvores e perdas na produtividade de madeira. Com o objetivo de conferir tolerância às geadas e às baixas temperaturas, foram realizadas buscas por genes candidatos e sequências promotoras responsivas às baixas temperaturas. Desta maneira, o objetivo proposto é testar a capacidade de genes sintéticos em conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento em plantas de *Eucalyptus*. Paralelamente, por se tratarem de plantas-modelo, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* foram transformadas para avaliar o potencial dos genes em relação a tolerância pretendida. Baseados em trabalhos recentes publicados na literatura científica, selecionamos sequências promotoras responsivas ao frio e sequências codificadoras de proteínas. As sequências promotoras escolhidas foram as dos genes *Cor15B* e *pbec1*, derivados de *A. thaliana* e *Prunus persiva*, respectivamente. As sequências codificadoras de proteínas escolhidas foram as dos genes *IRIPI* e *AnAFP* derivados de *Deschampsia antarctica* e *Ammopiptanthus nanus*, respectivamente. As sequências promotoras e codificadoras de proteínas, em conjunto com o terminador do gene da *nopalina sintase* de *Agrobacterium tumefaciens*, foram agrupadas em dois cassetes gênicos nomeados  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  e  $P_{Cor15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$ . As sequências nucleotídicas foram enviadas à empresa *GenScript* (EUA) onde foram sintetizadas e ligadas ao vetor plasmidial pUC57. Ambos os cassetes gênicos  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  e  $P_{Cor15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  foram isolados do vetor pUC57 com o uso da enzima HindIII e a combinação de HindIII e EcoRI, respectivamente. Posteriormente, os cassetes gênicos foram ligados aos vetores binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 (CAMBIA) clivados com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente. Células de *A. tumefaciens* *EHA105* foram transformadas geneticamente por choque térmico com os plasmídeos binários recombinantes e utilizadas para a transformação genética de plantas de *A. thaliana* e *N. tabacum*. As caracterizações moleculares e os ensaios de tolerância ao frio e ao

congelamento em plantas regeneradas serão realizados. Por fim, plantas de *E. globulus* x *E. urophylla* também serão transformadas, selecionadas, caracterizadas em nível molecular e testadas quanto à tolerância ao frio e/ou ao congelamento.

Palavras-chave: *Eucalyptus*, Tolerância, Frio, Geada, Congelamento, Plantas Transgênicas, Estresse Abiótico.

### ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* belongs to the Myrtaceae family and its major species are forest trees. Among main species, special forestry importance is given to *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. globulus*, and hybrids of these species, most of them employed in the paper and cellulose production. Winter low temperatures in the south region of Brazil and the absence of freeze tolerant traits in *Eucalyptus* combined to fast growing and high productivity limits considerably the growth and exploitation of the genus in South Brazil. The development of hybrid lineages like *E. globulus* x *E. urophylla*, combining a temperate and a tropical species, has proven great success in the forestry of subtropical regions. Nevertheless, erratic and repetitive frost and cold events damage considerably the trees and determine great losses in timber production. In an attempt to improve frost and cold tolerance in *Eucalyptus*, we have searched candidate genes and cold responsive promoters in the literature and adapted them for plant transformation. Our idea is to test the capacity of these synthetic genes to confer cold or freezing tolerance in *Eucalyptus* plants. In parallel, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* have also been employed to evaluate the potential of the genes to render the required tolerance. Based on recent research works available in the scientific literature, we searched for potential protein coding sequences reported to confer cold or freezing tolerance and cold responsive promoters. The promoter sequences selected were *Cor15B* and *pbec1* from *A. thaliana* and *Prunus persica* genes, respectively. The protein coding sequences selected were *AnAFP* and *IRIP1* from *Ammopiptanthus nanus* and *Deschampsia antarctica*, respectively. Sequences were ligated, together with the *nopaline synthase* gene terminator from *A. tumefaciens*, in two different gene cassettes called  $P_{Cor15B}$ -*IRIP1*- $T_{nos}$  and  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ . The two nucleotide sequences were sent to *GenScript* (EUA), where genes were synthesized and linked into pUC57 plasmidial vector. Both gene cassettes  $P_{Cor15B}$ -*IRIP1*- $T_{nos}$  and  $P_{pbec1}$ -

*AnAFP-T<sub>nos</sub>* were purified from pUC57 using the restriction enzyme HindIII and with the combination of HindIII and EcoRI, respectively. Thereafter, the artificial genes were ligated into pCAMBIA1300 and pCAMBIA2300 binary vectors, cleaved with the same enzymes utilized previously. *Agrobacterium tumefaciens EHA105* cells were genetically transformed by heat-shock with the recombinant binary plasmids and then utilized to *A. thaliana* and *N. tabacum* transformations. Transgenic plants will be molecularly characterized and, assays will be accomplished to test the cold or freezing tolerance possibly rendered to *A. thaliana* and *N. tabacum* transgenic plants. Further, *E. globulus* x *E. urophylla* plants will be transformed, selected, molecularly characterized and tested to cold or freezing tolerance.

Keywords: *Eucalyptus*, Tolerance, Cold, Frost, Freezing, Transgenic Plants, Abiotic Stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Plantio de <i>Eucalyptus</i> no território do Mato Grosso do Sul, Brasil .....	16
<b>Figura 2.</b> Ordenamento dos países maiores índices de produção de celulose e papel em 2012 .....	17
<b>Figura 3.</b> Composição (%) das receitas das exportações brasileiras de celulose e papel por região em 2014.....	18
<b>Figura 4.</b> Mapa do Brasil com áreas de cultivo e plantio de <i>Eucalyptus</i> nos principais estados brasileiros.....	19
<b>Figura 5.</b> Evolução da produção brasileira de celulose e papel nos últimos anos .....	19
<b>Figura 6.</b> Sintomas de baixas temperaturas e geadas em plantas de <i>Eucalyptus</i> . Imagem (A): Queima das brotações de <i>E. grandis</i> . Imagem (B): Árvore de <i>E. grandis</i> com sintomas de queima na copa .....	20
<b>Figura 7.</b> Efeitos e respostas mediadas em plantas em condições de frio e geadas .....	22
<b>Figura 8.</b> Representação do crescimento e expansão das estruturas cristalinas com as AFPs/AFGPs adsorvidas nos planos denominados de primas.....	24
<b>Figura 9.</b> Efeito na morfologia de cristais de gelo quando incubados e não incubados com AFPs em diferentes semanas .....	24
<b>Figura 10.</b> Gráfico representativo do processo de histerese térmica .....	25
<b>Figura 11.</b> Demonstração do processo de RI .....	26
<b>Figura 12.</b> Mapa dos vetores pUC57- <i>P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub></i> (A) e pUC57- <i>P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub></i> (B) .....	34
<b>Figura 13.</b> Mapa dos plasmídeos binários pCAMBIA1300 (A), pCAMBIA2300 (B) e pCAMBIA2301 (C) .....	37
<b>Figura 14.</b> Representação das sequências gênicas organizadas em dois cassetes gênicos de expressão <i>P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub></i> e <i>P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub></i> .....	45
<b>Figura 15.</b> Representação das sequências nucleotídicas dos promotores <i>P<sub>pbec1</sub></i> (A) e <i>P<sub>COR15B</sub></i> (B) com elementos de DNA cis-atuantes .....	47

<b>Figura 16.</b> Fragmentos de DNA de pUC57- $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ hidrolisados com a enzima BamHI. Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA plasmidial hidrolisadas (A) e padrões de bandas teóricos deste plasmídeo hidrolisado <i>in silico</i> utilizando a ferramenta <i>Serial Cloner 2.6.1</i> (B) .....	49
<b>Figura 17.</b> Fragmentos de DNA de pUC57- $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$ hidrolisadas com a enzima BamHI. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de amostras de DNA plasmidial hidrolisadas (A) e padrões de bandas teóricos deste plasmídeo hidrolisado <i>in silico</i> utilizando a ferramenta <i>Serial Cloner 2.6.1</i> (B) .....	50
<b>Figura 18.</b> Representações das coberturas dos dados de sequenciamentos de DNA ao longo dos cassetes gênicos $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ e $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$ .....	52
<b>Figura 19.</b> Eletroforese em gel de agarose de pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 após com CIAP e de cassetes gênicos $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ e $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$ purificados de pUC57... ..	54
<b>Figura 20.</b> Eletroforese em gel de agarose de amostras plasmidiais de pCAMBIA1300 contendo $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$ ou $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ (A) e pCAMBIA2300 contendo $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$ ou $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ (B) hidrolisadas pela enzima HindIII ou com a combinação de HindIII e EcoRI .....	55
<b>Figura 21.</b> Plantas de <i>A. thaliana</i> dois dias após a transformação genética pelo método de <i>floral-dip</i> .....	57
<b>Figura 22.</b> Esquematização do processo de regeneração de segmentos foliares em plantas de <i>N. tabacum</i> durante 1, 9 e 12 semanas após o cocultivo .....	59
<b>Figura 23.</b> Plantas de <i>N. tabacum</i> referentes às construções gênicas pCAMBIA2301 e pCAMBIA2300- $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ após 12 semanas de cocultivo .....	60
<b>Figura 24.</b> Imagem do gel de agarose de amostras de DNA extraídas de folhas de <i>N. tabacum</i> .....	61
<b>Figura 25.</b> Imagem da eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ e o T-DNA de pCAMBIA2301 no genoma de <i>N. tabacum</i> .....	62



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características dos cinco tipos de AFPs/AFGPs encontradas em peixes .....	27
<b>Tabela 2.</b> <i>Primers</i> utilizados neste trabalho para o sequenciamento de DNA dos cassetes gênicos .....	33
<b>Tabela 3.</b> Programa da PCR para confirmação da presença de $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ e do T-DNA de pCAMBIA2301 no genoma de <i>N. tabacum</i> .....	42
<b>Tabela 4.</b> Sequências codificadoras de proteínas analisadas capazes de conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento .....	44
<b>Tabela 5.</b> Sequências promotoras capazes de induzir transcrição em condições de baixas temperaturas.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico, do inglês, <i>abscisic acid</i>
ABF	Fator de ligação ao ABRE, do inglês, <i>ABRE-binding factor</i>
ABRAF	Associação brasileira de produtores de florestas plantadas
ABRE	Elemento responsivo ao ácido abscísico, do inglês, <i>abscisic acid response element</i>
AFGP	Glicoproteína anticongelante, do inglês, <i>antifreeze glycoprotein</i>
AFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados, do inglês, <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AFP	Proteína anticongelante, do inglês, <i>antifreeze protein</i>
AmpR	Gene de resistência à ampicilina
BAP	6-Benzilaminopurina, do inglês, <i>6-Benzylaminopurine</i>
BLAST	Ferramenta de busca de alinhamento local básico, do inglês, <i>basic local alignment search tool</i>
BOM	Região responsável pela mobilização do plasmídeo entre as células, do inglês, <i>basis of mobility</i>
bp	Par(es) de bases, do inglês, <i>base pairs</i>
BRACELPA	Associação brasileira de celulose e papel
CaMV poly(A) <i>signal</i>	Sinal de poliadenilação do vírus mosaico da couve flor
CaMV 35S	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
cat1 <i>intron</i>	Íntron-1 do gene codificador da proteína catalase de <i>Ricinus communis</i>
CBF	Proteínas de ligação às sequências contendo repetições de citosinas, do inglês, <i>C-repeat binding factor</i>
CI	Centro de inteligência de florestas
CIAP	Enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerros, do inglês, <i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
COR	Proteína regulada pelo frio (do inglês, <i>cold regulated</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados, do inglês, <i>Deoxynucleotide triphosphates</i>

DRE	Elementos responsivos à desidratação, do inglês, <i>dehydration responsive element</i>
DREB	Proteína de ligação a elementos responsivos à desidratação, do inglês, <i>dehydration responsive element binding</i>
EtBr	Brometo de etídio
<i>GUSA</i>	Gene repórter codificador da proteína $\beta$ -glucuronidase
h	Hora(s)
ha	Hectare
HygR	Gene de seleção de resistência frente a higromicina em plantas
KanR	Gene de seleção de resistência frente a canamicina em bactérias ou plantas
L	Litro
lacZa	Gene que codifica a proteína $\beta$ -galactosidade
LB	Borda Esquerda, do inglês, <i>left border</i>
LTRE	Elementos responsivos às baixas temperaturas, do inglês, <i>low temperature responsive element</i>
L-B	Meio de cultura Luria-Bertani
mA	Miliampere
MCS	Sítio Múltiplo de Clonagem, do inglês, <i>multiple cloning site</i>
mg	Miligramas
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
MS	Meio de Murashige & Skoog
MYBRS	Sequência reconhecida pela proteína MYB, do inglês, <i>MYB recognition sequence</i>
MYCSR	Sequência reconhecida pela proteína MYC, do inglês, <i>MYC recognition sequence</i>
M13 fwd	Sítio de anelamento para o <i>primer</i> M13 <i>Foward</i>
M13 rev	Sítio de anelamento para o <i>primer</i> M13 <i>Reverse</i>
NAA	1-Ácido naftalenoacético, do inglês, <i>1-naphthaleneacetic acid</i>
NeoR	Gene de seleção de resistência à neomicina e derivados como a canamicina em plantas
<i>ori</i>	Origem de replicação

<i>o/n</i>	Durante a noite, do inglês, <i>overnight</i>
pVS1 RepA	Origem de replicação referente ao organismo mutante <i>P. aeruginosa</i> resistente ao vanádio
pVS1 StaA	Região de estabilidade do genoma do organismos mutante <i>P. aeruginosa</i> resistente ao vanádio
RB	Borda direita, do inglês, <i>right border</i>
RI	Inibição da recristalização, do inglês, <i>recrystallization inhibition</i>
rpm	Rotações por minuto
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tf	Temperatura de congelamento, do inglês, <i>freeze temperature</i>
TH	Histerese térmica, do inglês, <i>thermal hysteresis</i>
Tm	Temperatura de fusão, do inglês, <i>fusion temperature</i>
T-DNA	DNA de transferência, do inglês, <i>transfer DNA</i>
T.E.	Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
V	<i>Volts</i>
6xHis	<i>Tag</i> contendo 6 resíduos do aminoácido histidina
µg	Microgramas
µL	Microlitros
°C	Graus celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. <i>Eucalyptus</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2. <i>Eucalyptus</i> no Brasil.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Efeitos e Respostas de Plantas Expostas às Baixas Temperaturas e Geadas .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3. Proteínas e Glicoproteínas Anticongelantes .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3.1. Histerese térmica .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.2. Inibição da recristalização .....</b>	<b>25</b>
<b>1.3.3. Estrutura de AFPs/AFGPs .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3.4. AFPs/AFGPs em plantas.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Engenharia Genética e Biotecnologia Vegetal.....</b>	<b>28</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Objetivos Específicos .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1. Revisar a literatura científica e selecionar sequências gênicas codificadoras de potenciais proteínas capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento em plantas, bem como de sequências promotoras responsivas às baixas temperaturas.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.2. Projetar cassetes gênicos constituídos de regiões promotora-codificadora-terminadora e encaminhar a síntese das sequências nucleotídicas. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.3. Adaptar as sequências nucleotídicas a plasmídeos binários e transformar <i>A. tumefaciens</i> com os mesmos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.4. Transformar plantas de <i>A. thaliana</i>, <i>N. tabacum</i> e <i>E. globulus</i> x <i>E. urophylla</i> com <i>A. tumefaciens</i> contendo os plasmídeos binários construídos. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.5. Realizar análises moleculares para avaliar o estado transgênico das plantas de <i>A. thaliana</i>, <i>N. tabacum</i> e <i>E. globulus</i> x <i>E. urophylla</i> e o número de cópias integradas via PCR e AFLP. ....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.6. Analisar a expressão dos cassetes gênicos por RT-qPCR nas plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i>, <i>N. tabacum</i> e <i>E. globulus</i> x <i>E. urophylla</i>. ....</b>	<b>30</b>

3.1.7. Detectar os peptídeos recombinantes referentes às sequências codificadoras de proteínas “anticongelantes” por <i>Western blot</i> em plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i> e <i>E. globulus</i> x <i>E. urophylla</i> .....	30
3.1.8. Realizar ensaios visando averiguar a tolerância ao frio e/ou congelamento em plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i> e <i>E. globulus</i> x <i>E. urophylla</i> .....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Revisão e Busca na Literatura por Potenciais Sequências Nucleotídicas de Interesse .....	30
4.2. Análises <i>in silico</i> .....	31
4.3. Vetores Plasmidiais de Clonagem e Expressão .....	31
4.3.1. Confirmação dos cassetes gênicos P <sub>COR15B-IRIPI1-T<sub>nos</sub></sub> e P <sub>p<sub>bec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub></sub> no vetor pUC57.....	31
4.3.2. Isolamento dos cassetes gênicos do vetor pUC57.....	33
4.3.3. Inserção dos cassetes gênicos de expressão nos vetores pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300.....	35
4.4. Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	38
4.5. Cultivo e Transformação de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	39
4.6. Cultivo e Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> <i>White Mammoth</i> .....	39
4.6.1. Cocultura.....	40
4.6.2. Indução de brotos .....	41
4.6.3. Alongamento e enraizamento .....	41
4.7. Extração de DNA de <i>N. tabacum</i> <i>White Mammoth</i> .....	41
4.8. Confirmação da presença de P <sub>p<sub>bec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub></sub> e T-DNA de pCAMBIA2301 no genoma de <i>N. tabacum</i> <i>White Mammoth</i> por PCR.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1. Definição de Cassetes Gênicos com Potencial Capacidade de Conferir a Tolerância Vegetal ao Frio e/ou ao Congelamento .....	42
5.2. Análises <i>in Silico</i> de Elementos de DNA <i>Cis</i> -atuantes nas Regiões Promotoras P <sub>p<sub>bec1</sub></sub> e P <sub>COR15B</sub> .....	46

5.3. Confirmação da Integridade dos Cassetes Gênicos no Vetor Plasmidial pUC57 .....	48
5.4. Isolamento dos Cassetes Gênicos do Vetor pUC57 e Ligação nos Vetores Binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 .....	54
5.5. Transformação Genética de <i>A. tumefaciens EHA105</i> com os Plasmídeos Binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 Contendo os Cassetes Gênicos.....	57
5.6. Cultivo e Transformação Genética de Plantas de <i>A. thaliana col-0</i> com Linhagens de <i>A. tumefaciens EHA105</i> .....	57
5.7. Cultivo e Transformação Genética de Plantas de <i>N. tabacum White Mammoth</i> com Linhagens de <i>A. tumefaciens EHA105</i> .....	58
5.8. Análise de Plantas de <i>N. tabacum White Mammoth</i> Transformadas Geneticamente .....	60
6. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	63
7. REFERÊNCIAS .....	64

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família das mirtáceas e é composto em sua maioria por arbóreas florestais. Atualmente, foram descritas mais de 700 espécies neste gênero e mais de 2.000 híbridos, sendo a Austrália e as ilhas adjacentes à sua localização as regiões de ocorrência natural. Devido à alta capacidade de adaptação em regiões tropicais e subtropicais e excelentes características silviculturais, as espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* estão disseminadas por diversas regiões do mundo incluindo, segundo dados de 2008 informados pelo *GIT Forest Consulting*, a África do Sul, o Brasil, o Chile, a China, a Espanha, a Índia, o Peru, o Portugal, a Tailândia, o Uruguai e o Vietnã (*GIT Forest Consulting*, 2008 – dados disponíveis em [http://git-forestry.com/download\\_git\\_eucalyptus\\_map\\_PT.htm](http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm)). A Figura 1 demonstra o plantio de *Eucalyptus* no território do Mato Grosso do Sul, Brasil. Entre as características silviculturais mais relevantes, o alto teor de celulose (43,8–54,4 %) e o relativo baixo teor de lignina (24,5–28,6 %) despertam o interesse do mundo inteiro para o plantio de *Eucalyptus* e exploração de sua madeira (MEGATON *et al.*, 2006).



**Figura 1. Plantio de *Eucalyptus* no território do Mato Grosso do Sul, Brasil.** Fonte: <http://www.painelflorestal.com.br/noticias/voce-e-a-floresta/mato-grosso-do-sul-quadruplica-area-plantada-com-eucalipto>.



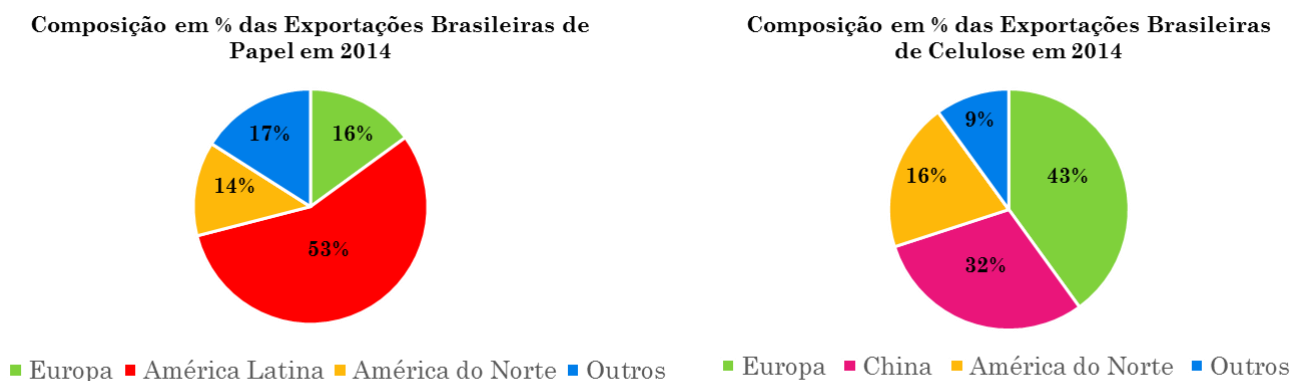
### 1.1.2. *Eucalyptus* no Brasil

O Brasil, além de possuir uma grande área de plantações com espécies de *Eucalyptus*, é detentor de um elevado nível técnico e científico no ramo da eucaliptocultura. Entre as principais áreas derivadas da cultura de *Eucalyptus*, destacam-se a fisiologia e o melhoramento vegetal, além da genética florestal, tornando possível o desenvolvimento de linhagens híbridas de espécies de *Eucalyptus* para diversos fins acadêmicos e industriais (ALZATE, 2004). Em 2012, segundo a Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA) e como ilustrado pela Figura 2, o Brasil encontrava-se na posição de quarto maior produtor de pastas de celulose e nono maior produtor de papel do mundo, produzindo aproximadamente 14 mil e 10 mil toneladas de celulose e papel, respectivamente (BRACELPA, 2012 - dados disponíveis em <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>). Dentre os destinos das exportações brasileiras de celulose e papel, de acordo com os dados publicados pela BRACELPA referentes às receitas de exportações obtidas em 2014, encontram-se a Europa, importadora de 43% de celulose e 16% de papel, América do Norte, importadora de 16% de celulose e 14% de papel, China, importadora de 32% de celulose e América Latina, importadora de 53% de papel (Figura 3) (BRACELPA, 2014 – dados disponíveis em <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/RM39BalancaComercial58-Fevereiro2014.pdf>).

**Maiores produtores de Celulose e Papel em 2012**

CELULOSE		PAPEL	
País	mil toneladas	País	mil toneladas
1. EUA	50.351	1. China	102.500
2. China	18.198	2. EUA	74.375
3. Canadá	17.073	3. Japão	26.083
4. Brasil *	13.977	4. Alemanha	22.630
5. Suécia	11.672	5. Suécia	11.417
6. Finlândia	10.237	6. Coreia do Sul	11.333
7. Japão	8.642	7. Canadá	10.751
8. Rússia	7.519	8. Finlândia	10.694
9. Indonésia	6.710	9. Brasil	10.260
10. Chile	5.155	10. Indonésia	10.247
11. Índia	4.095	11. Índia	10.242
12. Alemanha	2.636	12. Itália	8.664
Demais	10.376	Demais	90.789
<b>TOTAL MUNDO</b>	<b>166.641</b>	<b>TOTAL MUNDO</b>	<b>399.985</b>

**Figura 2. Ordenamento dos países detentores dos maiores índices de produção de celulose e papel em 2012.** Fonte BRACELPA (2012) - dados disponíveis em <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>.



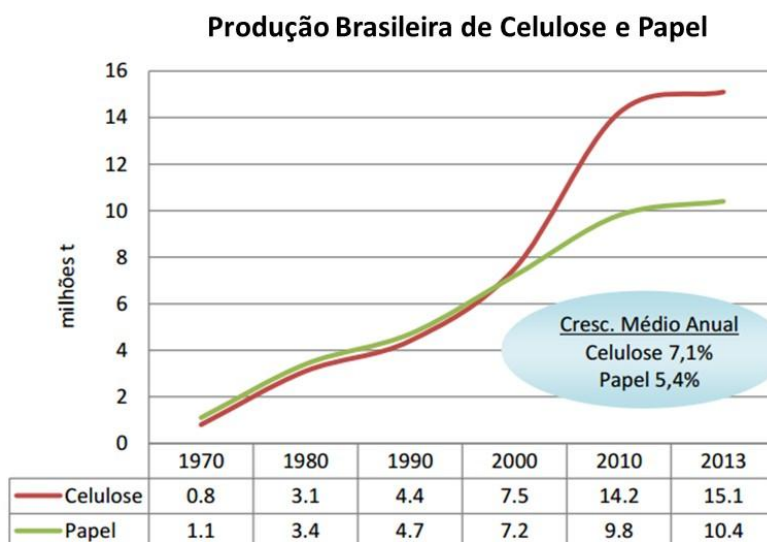
**Figura 3. Composição (%) das receitas das exportações brasileiras de celulose e papel por região em 2014.** Fonte: BRACELPA (2014) – dados disponíveis em <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/RM39BalancaComercial58-Fevereiro2014.pdf>.

O território brasileiro, de acordo com dados de 2012 da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF) e indicados na Figura 4, possui 5.102.030 hectares (ha) de plantios de *Eucalyptus* e os estados de Minas Gerais (28 %), São Paulo (20,4 %), Bahia (11,9 %), Mato Grosso do Sul (11,5 %), Rio Grande do Sul (5,6 %), Espírito Santo (4 %), Paraná (3,9 %) e Santa Catarina (2 %) detêm as maiores áreas (ABRAF, 2012 – dados disponíveis em <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/3910>). Entre as espécies cultivadas, segundo o Centro de Inteligência de Florestas (CI Florestas), destacam-se, pela abundância e pela importância na economia brasileira, *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. dunnii*, *E. saligna*, *E. viminalis*, *E. citriodora*, *E. camaldulensis*, *E. globulus* e híbridos destes (CI Florestas – dados disponíveis em <http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>). Entretanto, apesar da liderança tecnológica do setor brasileiro de árvores plantadas, observou-se nos últimos 14 anos um significativo aumento dos custos de produção de madeira no país (CAPO, 2015). Além disto, a diminuição nas taxas de crescimento de produção de papel e celulose (Figura 5) e as ameaças trazidas pelas mudanças climáticas criaram a necessidade de buscar novas espécies, variedades, linhagens e híbridos de *Eucalyptus*.

**Mapa do Brasil com áreas de cultivo e plantio de *Eucalyptus* nos principais estados brasileiros**



**Figura 4. Mapa do Brasil com áreas de cultivo e plantio de *Eucalyptus* nos principais estados brasileiros.** Estes dados são referentes ao ano de 2012. Fonte: ABRAF, 2012 – Dados disponíveis em <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/3910>.



**Figura 5. Evolução da produção brasileira de celulose e papel nos últimos anos.** É possível observar uma diminuição nas taxas de crescimento da produção de papel e celulose nos últimos anos. Fonte: <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/RM39BalancaComercial58-Fevereiro2014.pdf>.

## 1.2. Efeitos e Respostas de Plantas Expostas às Baixas Temperaturas e Geadas

O processo de escolha de espécies de *Eucalyptus* potencialmente aptas para o plantio no Brasil tem baseado-se principalmente em critérios climáticos. Contudo, o desenvolvimento da eucaliptocultura em regiões do sul do Brasil, onde no inverno são registradas baixas temperaturas, vem encontrando severas dificuldades diante da ausência de tolerância ao frio e às geadas combinada com crescimento rápido por parte das espécies comumente utilizadas em escala comercial (FLORIANI, 2008). As geadas e as baixas temperaturas podem causar desde queima (necrose) dos ramos laterais até a perda total da copa das árvores (Figura 6). Além dos danos diretos como morte ou perda das copas, os danos indiretos podem causar severos efeitos. Plantas afetadas por geadas e baixas temperaturas podem tornar-se mais sucessíveis à infecção por patógenos e ter o seu potencial de crescimento restringido, inviabilizando a formação de povoamentos comerciais (HIGA *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2001). Entre outros efeitos, as temperaturas abaixo de 0 °C propiciam a formação de cristais de gelo e, quando não há impedimento desta formação, ocasionam diversos danos à célula vegetal.

A



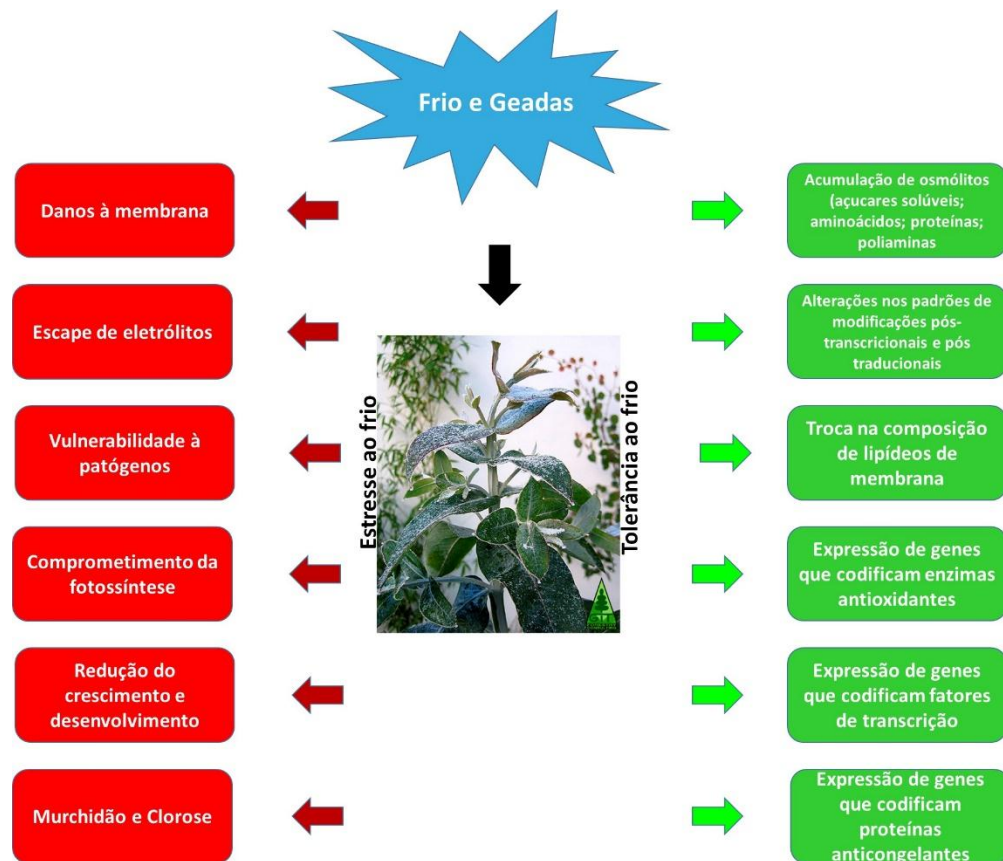
**B**



**Figura 6. Sintomas de baixas temperaturas e geadas em plantas de *Eucalyptus*. Imagem (A): Queima das brotações de *E. grandis*. Imagem (B): Árvore de *E. grandis* com sintomas de queima na copa. Fonte: (SANTOS *et al.*, 2001).**

Os cristais de gelo podem ocasionar a ruptura das membranas celulares e desidratação das células vegetais devido ao aumento da osmolaridade no meio extracelular, além de impedir o fluxo de moléculas e metabólitos entre o citosol e o meio extracelular (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). Como demonstrado na Figura 7, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos que permitem a sobrevivência em condições de exposição às baixas temperaturas. A acumulação de osmólitos, a detoxificação de espécies reativas de oxigênio através da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes, a alteração de composição dos lipídeos que constituem as membranas celulares, as alterações nos padrões de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, a expressão de genes que codificam proteínas regulatórias como fatores de transcrição com funções envolvidas na tolerância às baixas temperaturas e, por fim, a síntese de proteínas e glicoproteínas anticongelantes (AFPs e AFGPs, do inglês, *antifreeze proteins* e *antifreeze glycoproteins*, respectivamente), são exemplos de mecanismos

já descritos na literatura científica que permitem às plantas tolerar estresses de baixas temperaturas (GIL *et al.*, 2013; MEGHA *et al.*, 2013).



**Figura 7. Efeitos e respostas mediadas em plantas em condições de frio e geadas.** Fonte: Adaptado de (MEGHA *et al.*, 2013).

### 1.3. Proteínas e Glicoproteínas Anticongelantes

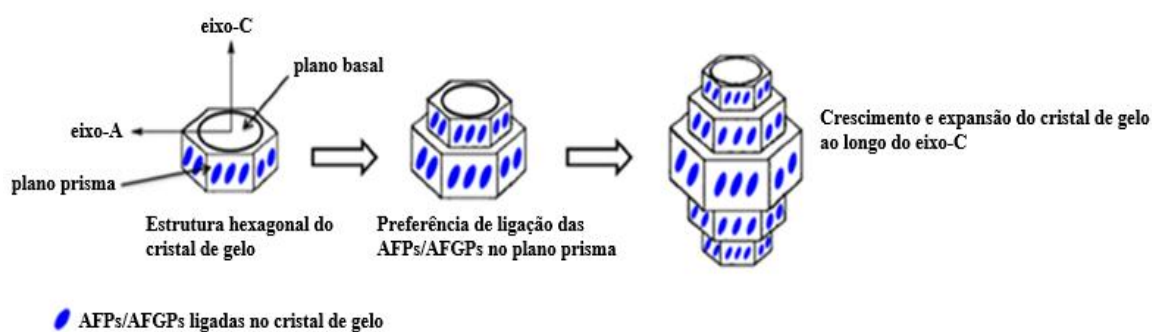
As AFPs/AFGPs são proteínas inicialmente encontradas e caracterizadas em peixes teleósteos do continente da Antártida. Desde suas descobertas em peixes, diversos tipos de AFPs/AFGPs foram também identificados em espécies de bactérias, fungos, insetos e plantas. Entretanto, a distribuição destas proteínas é limitada às espécies expostas aos ambientes com baixas temperaturas (EWART *et al.*, 1998). As AFPs/AFGPs possuem afinidade por cristais de gelo devido à complementaridade estrutural encontrada entre os domínios proteicos e as superfícies das estruturas cristalinas. A ligação das proteínas a estas superfícies proporciona

efeitos protetivos em relação aos danos que o congelamento causa às células e, como consequência, apresenta dois efeitos práticos: a histerese térmica (TH, do inglês, *thermal hysteresis*) e a inibição da recristalização (RI, do inglês, *recrystallization inhibition*). Ambos os efeitos são extremamente importantes para a sobrevivência e a manutenção das atividades metabólicas de organismos que possuem a capacidade de sobreviver em condições extremas de baixas temperaturas (JOHN *et al.*, 2009).

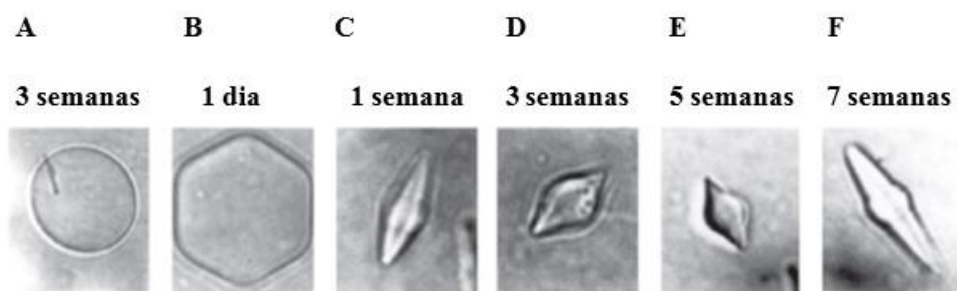
### 1.3.1. Histerese térmica

Os cristais de gelo contêm dois planos distintos em suas estruturas chamados de plano basal e plano prisma. O crescimento e a expansão dos cristais de gelo devem-se à associação de novas moléculas de água nestes planos e podem acontecer em direção aos eixos denominados de A (sentido horizontal) e C (sentido vertical). Na ausência de AFPs/AFGPs, o crescimento e a expansão dos cristais ocorrem mais rapidamente no plano prisma (em direção ao eixo-A), formando uma estrutura cristalina mais larga e em forma de disco (GUPTA *et al.*, 2014).

A adsorção de AFPs/AFGPs ocorre em planos específicos das superfícies de cristais de gelo. Preferencialmente ocorre no plano prisma e, assim, impede a associação das demais moléculas de água neste plano e, logo, o crescimento e a expansão dos cristais ao longo do eixo-A é interrompido (Figura 8). Como consequência imediata desta ligação, ocorre uma diminuição na temperatura de solidificação de soluções que contêm AFPs/AFGPs e, decorrente disto, há também uma diminuição na temperatura de crescimento e na expansão dos cristais por meio de um mecanismo não coligativo, isto é, um efeito que não depende do abaixamento do ponto de congelamento da água pela presença de solutos. Apesar disto, como pode ser visualizado na Figura 9, os cristais de gelo podem continuar crescendo e se expandindo caso a solução alcance um valor abaixo da nova temperatura de solidificação, embora aconteça apenas ao longo do eixo-C, alterando as características morfológicas dos cristais de circular e achatado para hexágono-bipiramidal (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).



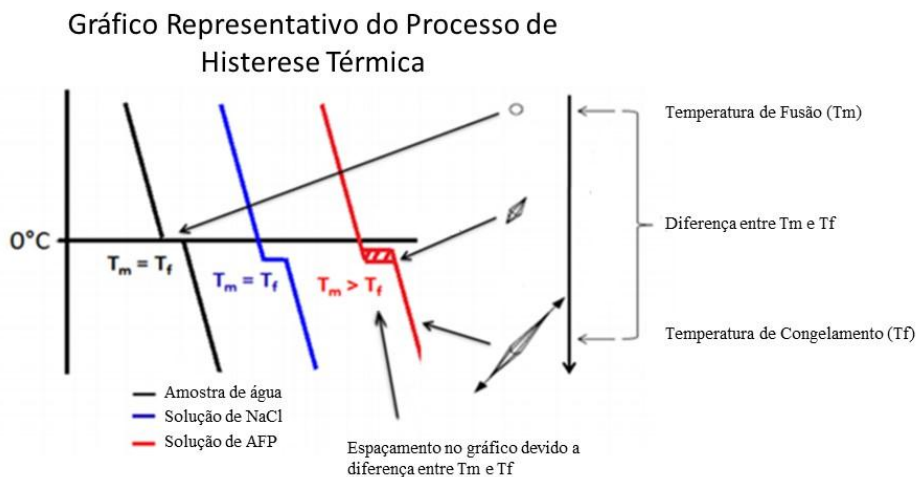
**Figura 8. Representação do crescimento e da expansão das estruturas cristalinas de gelo com as AFPs/AFGPs adsorvidas nos planos denominados primas. As AFPs/AFGPs impedem o crescimento e expansão dos cristais de gelo ao longo do eixo-A. Fonte adaptado de (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).**



**Figura 9. Efeito na morfologia de cristais de gelo quando incubados (B-F) e não incubados (A) com AFPs em diferentes semanas. Quando incubados com AFPs, é possível observar a transição nas estruturas morfológicas dos cristais de gelo de circular e achatado para hexágono-bipiramidal. (Fonte: Adaptado de MOFFATT *et al.*, 2006)**

Entretanto, nestas situações, o ponto de fusão (passagem do estado sólido para o líquido) permanece inalterado. Este fenômeno é conhecido como TH e as suas taxas são medidas como a diferença entre as temperaturas de fusão e solidificação (Figura 10; ATICI *et al.*, 2003; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013; MOFFATT *et al.*, 2006).

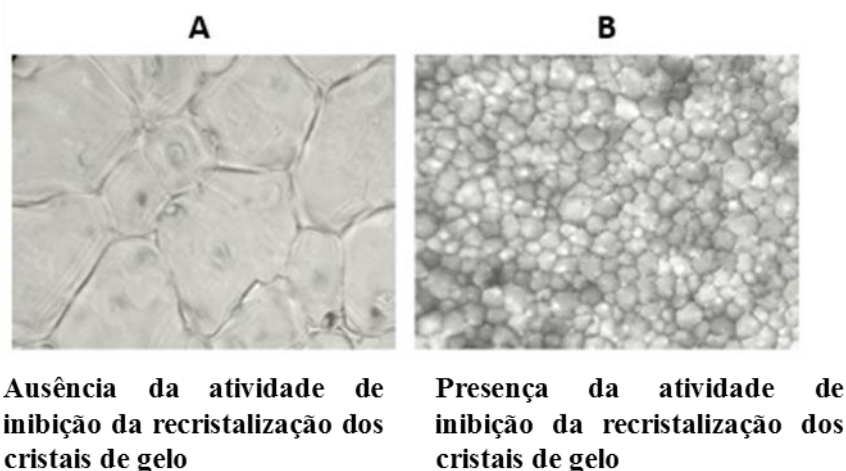




**Figura 10. Gráfico representativo do processo de histerese térmica.** Em amostras contendo somente água, o ponto de fusão ( $T_m$ , do inglês, *melting temperature*) e solidificação ( $T_f$ , do inglês, *freezing temperature*), é o mesmo, ou seja,  $0^\circ\text{C}$  (Linha preta). Em soluções contendo água e cloreto de sódio (NaCl), ocorre uma diminuição nas  $T_m$  e  $T_f$ , entretanto, ambas temperaturas alteradas permanecem idênticas uma a outra (Linha azul). Em soluções contendo AFPs/AFGPs, ocorre uma diminuição na  $T_f$ , entretanto, o  $T_m$  permanece inalterado (Linha vermelha). Sendo assim, como demonstrado na Figura, ocorre um espaçamento no gráfico entre os pontos devido a diferença entre a  $T_m$  e  $T_f$ . De acordo com a Figura, também é possível identificar as transições de morfologias dos cristais de gelo: em temperaturas de  $0^\circ\text{C}$  na amostra contendo apenas água, a morfologia apresentada é circular e achatada; em temperaturas iguais a  $T_f$  em soluções contendo AFPs, a morfologia apresentada é hexágono-bipiramidal; em temperaturas abaixo da  $T_f$  em soluções contendo AFPs, a morfologia apresentada é hexágono-bipiramidal alongada. (Fonte: Adaptado de CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Inibição da recristalização

As AFPs/AFGPs apresentam um segundo tipo de atividade, além de impedir o crescimento e a expansão dos cristais de gelo. As ligações de AFPs/AFGPs impedem a associação entre pequenos cristais de gelo, evitando a formação de grandes cristais nos ambientes celulares e extracelulares (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). Este fenômeno é conhecido como RI (Figura 11) e a manutenção de pequenos cristais em condições de congelamento é a principal atividade responsável pela qual as AFPs/AFGPs de plantas promovem a tolerância em ambientes com baixas temperaturas (ATICI *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2005; ROUDSARI *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2014; USTUN *et al.*, 2015)

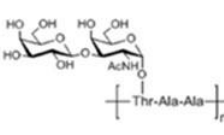






**Figura 11: Demonstração do processo de RI.** Em soluções contendo AFPs/AFGPs, é possível observar a ausência de grandes cristais de gelo. A: Solução sem AFPs/AFGPs. B: Solução com AFPs/AFGPs. (Fonte: Adaptado de CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

### 1.3.3. Estrutura de AFPs/AFGPs

Diversos tipos de estruturas já foram identificados em AFPs/AFGPs (Tabela 1). Em peixes, estas proteínas variam em massa molecular (3 a 33 kDa) e estruturas secundárias, podendo adquirir conformações com predominância de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$  e estruturas desordenadas (*random coils*). As AFPs/AFGPs de peixes são classificadas em cinco tipos, nomeados de: AFGPs; AFP-I; AFP-II; AFP-III; AFP-IV (MIDDLETON *et al.*, 2012; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). As AFGPs contêm de 4 a 50 sequências repetidas em *tandem* dos resíduos de aminoácidos alanina-alanina-treonina com um dissacarídeo ligado em cada extremidade hidroxila dos resíduos de treonina. As AFPs-I são caracterizadas por conter regiões ricas em resíduos de alanina e predominância de estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélices. As AFPs-II são proteínas ricas em pontes de dissulfeto e contém regiões mistas entre as estruturas secundárias de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ . Além disto, as AFPs desta classe são estruturalmente globulares. As AFPs-III são ricas em curtas estruturas de folhas- $\beta$ , e as AFP-IV são proteínas com feixes helicoidais e ricas em resíduos de alanina (GRAETHER *et al.*, 2000; KANDASWAMY *et al.*, 2011).

**Tabela 1. Representação das características dos cinco tipos de AFPs/AFGPs encontradas em peixes.** (Fonte: Adaptado de CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

Características	AFGP	AFP-I	AFP-II	AFP-III	AFP-IV
<b>Massa (kDa)</b>	2,6 - 33	3,3 - 4,5	11 - 24	6,5	12
<b>Propriedades</b>	Repetições em tandem de A-A-T; Dissacarídeos	Regiões ricas em alanina; $\alpha$ -hélices	Pontes dissulfeto; $\alpha$ -hélices; Folhas- $\beta$	Folhas- $\beta$	Regiões ricas em alanina; Feixes helicoidais
<b>Estrutura representativa</b>					
<b>Organismos</b>	Peixes antárticos da subordem notothenioids; peixes da espécie <i>Gadus morhua</i>	Peixes da família Pleuronectidae; peixes da superfamília Cottoidea	Peixes das famílias: Hemiripteridae; Osmeridae; Chupeidae.	Peixes das espécies: <i>Zoarces americanus</i> e <i>A. lupus</i> . Peixes da família oaridae	Peixes da espécie <i>M. octodecemspinosus</i>

#### 1.3.4. AFPs/AFGPs em plantas

Em plantas, as AFPs/AFGPs foram identificadas em *Ammopiptanthus nanus*, *Ammopiptanthus mongolicus*, *Brasica oleracea*, *Daucus carota*, *Deschampsia antarctica*, *Lolium perene*, *Secale cereale*, *Solanum dulcamara*, entre outras espécies (DUMAN, 1994; HON *et al.*, 1994; CHUN *et al.*, 1998; WORRALL *et al.*, 1998; FEI *et al.*, 2000; ATICI *et al.*, 2003; PUDNEY *et al.*, 2003; JOHN *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009). De acordo com DENG *et al.* (2014), as inibições do crescimento e a recristalização dos cristais de gelo preferencialmente ocorrem no espaço extracelular. Além disto, diversas AFPs/AFGPs foram localizadas na região do apoplasto das células vegetais (GRIFFITH *et al.*, 1992; MARENTEZ *et al.*, 1993; HON *et al.*, 1994; ANTIKAINEN *et al.*, 1997; ATICI *et al.*, 2003). Devido à alta concentração de solutos no interior das células, a temperatura de congelamento da região do apoplasto é maior do que a temperatura de congelamento nos fluídos do citosol. Sendo assim, as formações dos cristais de gelo iniciam-se no apoplasto e, portanto, as AFPs/AFGPs teriam a função de impedir a formação de gelo extracelularmente. Contudo, em alguns tipos de AFPs/AFGPs, não foram identificadas sequências de aminoácidos referentes a peptídeos-sinais de exportação ao apoplasto, sugerindo que estas proteínas podem também desempenhar suas atividades de anticongelamento no citosol (DENG *et al.*, 2014).

Em plantas, pouco se conhece a respeito das estruturas de AFPs/AFGPs. Segundo KANDASWAMY *et al.* (2010), nenhuma AFPs/AFGPs de plantas havia sido cristalizada até o ano de 2010. Entretanto, de acordo com a sequência de aminoácidos e com o uso de ferramentas de bioinformática, predições de estruturas secundárias já foram realizadas. De acordo com MUTHUKUMARAN *et al.* (2011), 27 AFPs/AFGPs de plantas foram analisadas quanto às suas estruturas secundárias. Destas, em 15 foram identificadas estruturas em folhas- $\beta$ , em 7 foram identificadas estruturas em  $\alpha$ -hélices e em 5 foram identificadas ambas as estruturas. Segundo GUPTA *et al.* (2014), as AFPs/AFGPs de plantas são ricas em estruturas secundárias do tipo folhas- $\beta$ , mas, apesar disto, estas proteínas, a princípio, não compartilham homologia entre si e podem ter evoluído independentemente ao longo da evolução das plantas superiores.

O conhecimento das classes e funções de proteínas AFPs/AFGPs bem como de outras classes de proteínas capazes de conferir a tolerância ao estresse por frio abre um horizonte promissor para a geração de plantas tolerantes a este tipo de estresse. A alteração do padrão de expressão dos genes codificadores ou a introdução destes genes em plantas que não os possuem por engenharia genética é uma das possibilidades de obtenção de plantas mais tolerantes.

#### **1.4. Engenharia Genética e Biotecnologia Vegetal**

A engenharia genética é o conjunto de técnicas que permite a manipulação de DNA de determinado organismo de maneira artificial como, por exemplo, pelo isolamento e transferência de genes específicos. Por meio destas técnicas, em conjunto com os avanços na área de biotecnologia, tornou-se possível a produção de organismos geneticamente modificados com traços de interesse. Neste contexto, plantas transgênicas tornaram-se uma alternativa para se obter linhagens com características específicas como resistência a insetos e doenças, melhoria na capacidade fotossintética (e, conseqüentemente, no crescimento das plantas), melhor forma ou arquitetura das plantas, maior densidade ou maior quantidade de fibras, tolerância a herbicidas e a estresses abióticos como calor, acidez do solo e frio (CAPO, 2015). Alguns exemplos a destacar incluem as plantas transgênicas expressando genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* e que tornaram estas resistentes a insetos lepidópteros (QI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010); a expressão do gene *BADHI* em tomateiros foi capaz de conferir tolerância à salinidade (JIA *et al.*, 2002); em trigo, a expressão do gene *PSC5* foi capaz de tornar as plantas tolerantes à seca (VENDRUSCOLO *et al.*, 2007). Entretanto, poucos são os exemplos em que foram obtidas, de fato, plantas transgênicas tolerantes às baixas temperaturas e geadas. Além

disto, ainda não há qualquer utilização comercial de plantas transgênicas com estas características de interesse. A descoberta de AFP/AFGP e o recém entendimento dos mecanismos de atuação destas proteínas tornam-nas como alternativas promissoras para obtenção de plantas transgênicas tolerantes ao frio, geadas e, até mesmo, ao congelamento.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Atualmente, há um número bastante reduzido de protocolos de transformação genética e de regeneração de plantas transgênicas de *Eucalyptus* disponíveis na literatura científica. Além disto, também é escasso o número de genes que potencialmente podem conferir tolerância em plantas às condições de baixas temperaturas e geadas. Deste modo, devido à ausência da tolerância referida e os danos que estes estresses causam em plantas do gênero *Eucalyptus*, há uma enorme necessidade do desenvolvimento de linhagens de *Eucalyptus* com potenciais genes que possam conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento. Linhagens de *E. urophylla* x *E. globulus* têm demonstrado resultados promissores em relação à transformação genética mediada por agrobactérias e ao processo de regeneração *in vitro*. Além destas, plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* estão sendo utilizadas para avaliar o potencial dos genes em conferir a tolerância pretendida. A transgenia é uma nova ferramenta que tem se associado ao melhoramento genético clássico e que potencialmente poderá auxiliar na obtenção de variedades de *Eucalyptus* tolerantes ao frio e/ou ao congelamento.

## **3. OBJETIVOS**

O objetivo principal que norteia o presente estudo é a obtenção de plantas transgênicas de linhagens de *E. globulus* x *E. urophylla* expressando genes potencialmente capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento.

### **3.1. Objetivos Específicos**

**3.1.1.** Revisar a literatura científica e selecionar sequências gênicas codificadoras de potenciais proteínas capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento em plantas, bem como de sequências promotoras responsivas às baixas temperaturas.

**3.1.2.** Projetar cassetes gênicos constituídos de regiões promotora-codificadora-terminadora e encaminhar a síntese das sequências nucleotídicas.

**3.1.3.** Adaptar as sequências nucleotídicas a plasmídeos binários e transformar *A. tumefaciens* com os mesmos.

**3.1.4.** Transformar plantas de *A. thaliana*, *N. tabacum* e *E. globulus* x *E. urophylla* com *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos binários construídos.

**3.1.5.** Realizar análises moleculares para avaliar o estado transgênico das plantas de *A. thaliana*, *N. tabacum* e *E. globulus* x *E. urophylla* e o número de cópias integradas via PCR e AFLP.

**3.1.6.** Analisar a expressão dos cassetes gênicos por RT-qPCR nas plantas transgênicas de *A. thaliana*, *N. tabacum* e *E. globulus* x *E. urophylla*.

**3.1.7.** Detectar os peptídeos recombinantes referentes às sequências codificadoras de proteínas anticongelantes por *Western blot* em plantas transgênicas de *A. thaliana*, *N. tabacum* e *E. globulus* x *E. urophylla*.

**3.1.8.** Realizar ensaios visando averiguar a tolerância ao frio e/ou congelamento em plantas transgênicas de *A. thaliana*, *N. tabacum* e *E. globulus* x *E. urophylla*.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Revisão e Busca na Literatura por Potenciais Sequências Nucleotídicas de Interesse**

Com base em trabalhos recentes publicados na literatura científica, realizamos buscas nas plataformas *PubMed* e *Google Scholar* por potenciais sequências promotoras responsivas ao frio e/ou ao congelamento e sequências codificadoras de proteínas potencialmente capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento. As sequências promotoras foram analisadas e selecionadas de acordo com trabalhos nos quais os autores demonstraram que as mesmas eram capazes de induzir a transcrição de genes repórteres apenas em condições de baixas

temperaturas. As sequências codificadoras de proteínas foram analisadas e selecionadas de acordo com trabalhos nos quais foi demonstrado que os genes foram capazes de conferir a tolerância ao frio e/ou ao congelamento.

As sequências promotoras e codificadoras definidas foram agrupadas em dois diferentes cassetes gênicos de expressão, juntamente com a sequência terminadora. Para a realização de futuras etapas de recombinação entre as sequências promotoras e codificadoras de ambos os cassetes gênicos, sítios de reconhecimento e hidrólise pelas enzimas de restrição NcoI e BamHI foram inseridos sobre a sequência ATG do sítio de início de tradução e após o códon de término da tradução, respectivamente. O restante dos sítios de restrição NcoI e BamHI endógenos presentes nos cassetes gênicos foram alterados pela modificação do último nucleotídeo do sítio de restrição. As sequências definidas foram enviadas para a empresa GenScript (EUA) onde foram sintetizadas e ligados ao vetor plasmidial pUC57.

## **4.2. Análises *in silico***

Os mapas representativos dos vetores plasmidiais foram construídos com o uso da ferramenta *SnapGene* 2.8. As reações de hidrólise *in silico* foram realizados com a ferramenta *Serial Cloner* 2.6.1. As análises de elementos *cis*-atuantes de DNA nas regiões promotoras foram realizadas pela ferramenta *online SOGO* (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>). A ferramenta *online* de busca de alinhamento local básico (*BLAST*, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool* – [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_PROG\\_DEF=megaBlast&BLAST\\_SPEC=blast2seq](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seq)) foi utilizada para os alinhamentos aos pares entre os produtos resultantes das reações de sequenciamento de DNA e as sequências originais dos cassetes gênicos.

## **4.3. Vetores Plasmidiais de Clonagem e Expressão**

### **4.3.1. Confirmação dos cassetes gênicos $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$ e $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ no vetor pUC57**

Os cassetes gênicos  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  presentes no vetor pUC57 (GenScript) foram entregues adsorvidos em papel-filtro (4 µg). Os ácidos nucleicos foram

eluídos com 200 µL de tampão Tris-EDTA (T.E.) em microtubos do tipo *Eppendorf* e //permaneceram *overnight* (*o/n*) a 4 °C. Um µL de cada alíquota de plasmídeos contendo os cassetes gênicos eluídos foi utilizado para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2*. 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 (L-B) sólido contendo 100 mg/L de ampicilina. As placas permaneceram em estufa a 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 rotações por minuto (rpm) em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). A seguir, as minipreparações de plasmídeos foram realizadas utilizando-se o método de lise alcalina descrito por BIMBOIM *et al.* (1979) com alterações propostas por STEPHEN *et al.* (1990). Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 20 µL de T.E. e posteriormente quantificados em Nanodrop (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

Para a constatação de que os plasmídeos preparados continham os cassetes  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ , foram realizadas reações de hidrólise com o uso da enzima de restrição BamHI (New England Biolabs) seguindo-se instruções do fabricante. As reações permaneceram a 37 °C durante 1,5 hora (h). Os produtos totais das reações foram aplicados em gel de agarose a 0.8 % e corado com brometo de etídio (EtBr) a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 70 volts (V) e 110 mA durante 1,5 h. Posteriormente, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e a imagem digital foi obtida pelo emprego do sistema Gel-Doc (Bio-Rad) conforme parâmetros padrões recomendados pelo fabricante.

A confirmação da integridade dos cassetes gênicos foi feita por sequenciamento de DNA plasmidial. *Primers* específicos para os cassetes gênicos  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  foram projetados baseados nas sequências promotoras e codificadoras de proteínas descritas por TITARELLI *et al.* (2009), CHEW *et al.* (2012), LI *et al.* (2013), DENG *et al.* (2014) e com o uso da ferramenta *online OligoAnalyzer 3.1* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Na Tabela 2 estão indicados todos os *primers* utilizados no projeto. As sequências projetadas foram sintetizadas pela *Integrated DNA Technologies* (EUA). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

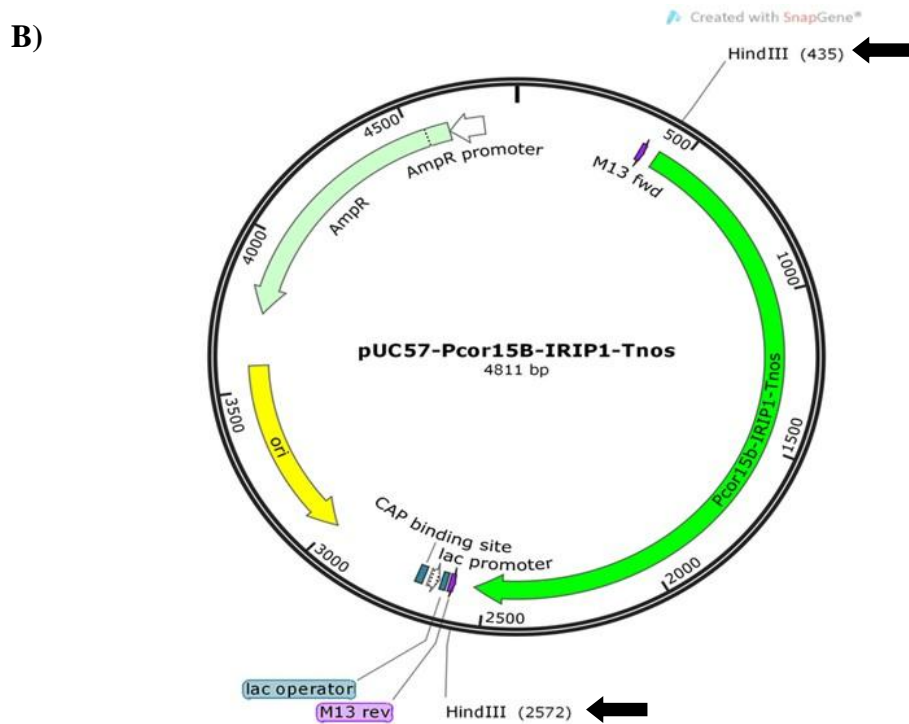
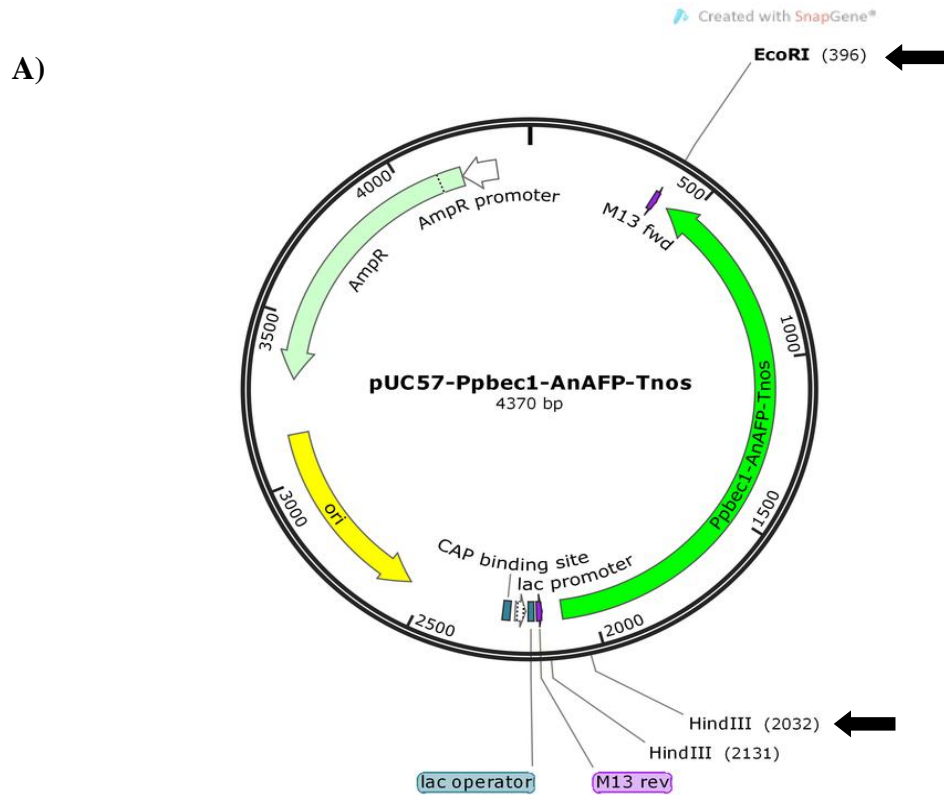


Tabela 2. *Primers* utilizados neste trabalho para o sequenciamento de DNA dos cassetes gênicos.

Nome	Sequência (5'– 3')	Tamanho (bp)	Temperatura média de desnaturação (T <sub>m</sub> , °C)
<b>PCOR15B-Forward</b>	CACCTCCAAGCTTTAAATAATGAGTAATTATAAG	34	50,7
<b>PPBEC1-Forward</b>	CACCATCTCTATTTACTAGAAAGTCTTTTTCC	31	50,7
<b>TNOS-Reverse</b>	CCCGATCTAGTAACATAGATGA	22	50,7
<b>PCOR15B-245/224- Reverse</b>	AGTGGATCAATGTTGATTACAA	22	50,0
<b>PCOR15B-933/954-Forward</b>	CATAGAAATGGTTACACGTAAC	22	49,2
<b>PPBEC1-234/209-Reverse</b>	CTTACTTCTTTGTTTTATTCTTGICA	26	50,2
<b>PPBEC1-570/588-Forward</b>	TTTGAGAAGGGTCATGCTA	19	50,7
<b>IRIP1-229/213-Reverse</b>	GTAGCTGCAACGTAGTG	17	50,3
<b>IRIP1-446/469-Forward</b>	TAATTGGGAGTGACAATATCATAA	24	49,7
<b>ANAFP-259/241-Reverse</b>	CATCACCCCTTGTAATCACC	19	50,5
<b>ANAFP-380/399-Forward</b>	ATTACAAGGGTGAAAACACG	20	50,8
<b>TNOS 30/48-Forward</b>	AAGATTGAATCCTGTGACC	19	50,4
<b>M13 (-21)-Forward</b>	TGTAAAACGACGGCCAGT	18	54,4
<b>M13-Reverse</b>	CAGGAAACAGCTATGACC	18	50,1

#### 4.3.2. Isolamento dos cassetes gênicos do vetor pUC57

Na Figura 12 estão representados os mapas de pUC57 contendo as sequências gênicas sintetizadas pela empresa GenScript com a indicação dos sítios das enzimas de restrição utilizadas para o isolamento dos cassetes gênicos. Os cassetes gênicos *PCOR15B-IRIP1-Tnos* e *Ppbec1-AnAFP-Tnos* foram isolados do vetor plasmidial pUC57 via reação de hidrólise com o uso da enzima de restrição HindIII (Promega) e a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI (Promega), respectivamente, utilizando-se as condições ideais recomendadas pelo fabricante. As amostras permaneceram incubadas a 37 °C durante 3 h e os volumes totais das reações foram aplicados em gel de agarose a 0.8 % e corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese conforme descrito no item 4.3.1.



**Figura 12.** Mapa dos vetores **pUC57-P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>** (A) e **pUC57-P<sub>cor15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub>** (B). Nas imagens, é possível identificar os elementos dos plasmídeos esquematizados: a origem de replicação (*ori*); o promotor e o gene de resistência à ampicilina em bactérias (*AmpR promoter*, e *AmpR*, respectivamente); os sítios de anelamento para os *primers* M13 *Forward* e M13 *Reverse* (M13 fwd e M13 rev, respectivamente) flanqueando o sítio múltiplo de clonagem (MCS, do inglês, *multiple site*)

*cloning*); o operador lac (*lac operator*); o promotor lac (*lac promoter*); o sítio de ligação à proteína CAP (*CAP binding site*). Na Imagem A, as setas em cor preta referem-se aos sítios de restrição das enzimas HindIII (na região 5' do cassete gênico) e EcoRI (no MCS) utilizados para isolar o cassete gênico  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ . Na Imagem B, as setas em cor preta referem-se aos sítios de restrição da enzima HindIII (na região 5' do cassete gênico e no MCS) utilizados para isolar o cassete gênico  $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$ . Os vetores pUC57- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  e pUC57- $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  contêm 4370 e 4811 pares de bases (bp, do inglês, *base pairs*).

Os fragmentos referentes aos cassetes  $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  e  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  foram purificados do gel de agarose com o uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Um  $\mu$ L da solução de cada fragmento purificado foi aplicado em gel de agarose a 0.8 % e corado com EtBr a 0,01  $\mu$ g/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 65 mA conforme citado em 4.3.1. Os fragmentos purificados foram quantificados em Nanodrop.

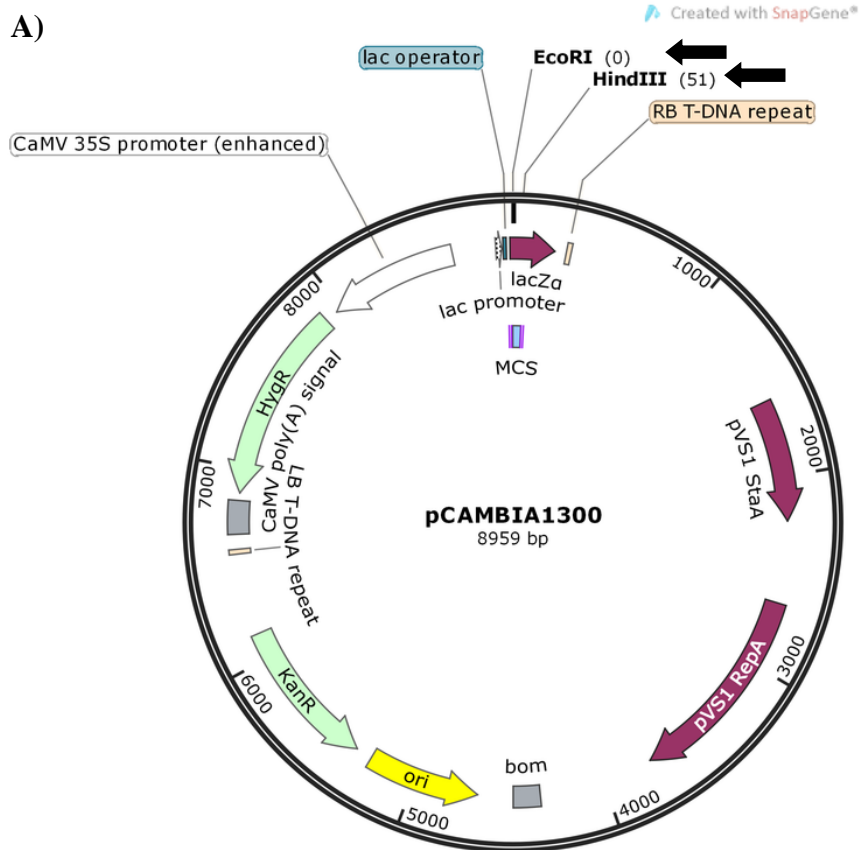
#### **4.3.3. Inserção dos cassetes gênicos de expressão nos vetores pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300**

Para o recebimento dos cassetes gênicos, os vetores binários de expressão pCAMBIA1300 (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) e pCAMBIA2300 (2  $\mu$ g/ $\mu$ L; CAMBIA) foram também hidrolisados com a enzima de restrição HindIII e a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI. Posteriormente, as extremidades hidrolisadas dos vetores pCAMBIA foram desfosforilados utilizando-se a enzima fosfatase alcalina de intestinos de bezerros (CIAP, do inglês, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*; Promega) seguindo as instruções do fabricante. Um  $\mu$ L de cada produto das reações de desfosforilação foi aplicado em gel de agarose a 0.8 % e corado com EtBr a 0,01  $\mu$ g/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 110 mA conforme citado em 4.3.1. Por fim, os vetores desfosforilados foram quantificados em Nanodrop.

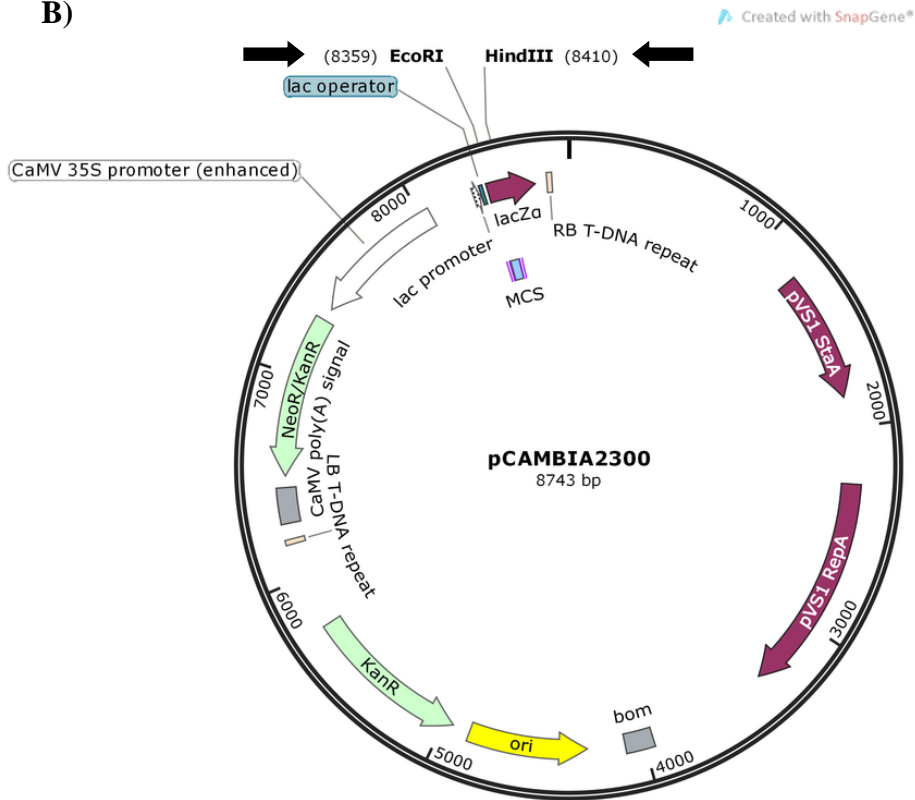
Posteriormente, os cassetes gênicos  $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (50 ng/ $\mu$ L) e  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (50 ng/ $\mu$ L) foram ligados aos vetores binários pCAMBIA1300 (50 ng/ $\mu$ L) e pCAMBIA2300 (100 ng/ $\mu$ L) previamente hidrolisados e com as extremidades desfosforiladas, utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega) e seguindo as instruções informadas pelo fabricante. Na Figura 13 estão demonstrados os mapas dos vetores da série pCAMBIA. Células de *E. coli OmniMax 2* foram transformadas geneticamente, conforme descrito no item 4.3.1, com 10  $\mu$ L dos produtos

resultantes das reações de ligação. A seguir, 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L das suspensões de células foram distribuídas em meio L-B sólido contendo 50 mg/L de canamicina. As colônias obtidas foram inoculadas em 1,5 mL de meio L-B líquido contendo 50 mg/L de canamicina e as culturas foram mantidas *o/n* a 37 °C e a 180 rpm em agitador rotacional. Posteriormente, como descrito no item 4.3.1, foram realizadas minipreparações plasmidiais.

Para averiguar se as reações de ligação haviam sido realizadas com sucesso, as amostras de DNA plasmidial dos vetores da série pCAMBIA contendo os cassetes gênicos  $P_{COR15B}$ -*IRIP1*- $T_{nos}$  e  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  foram submetidas a reações de hidrólise utilizando-se a enzima de restrição *Hind*III e a combinação entre as enzimas *Hind*III e *Eco*RI.



B)



C)

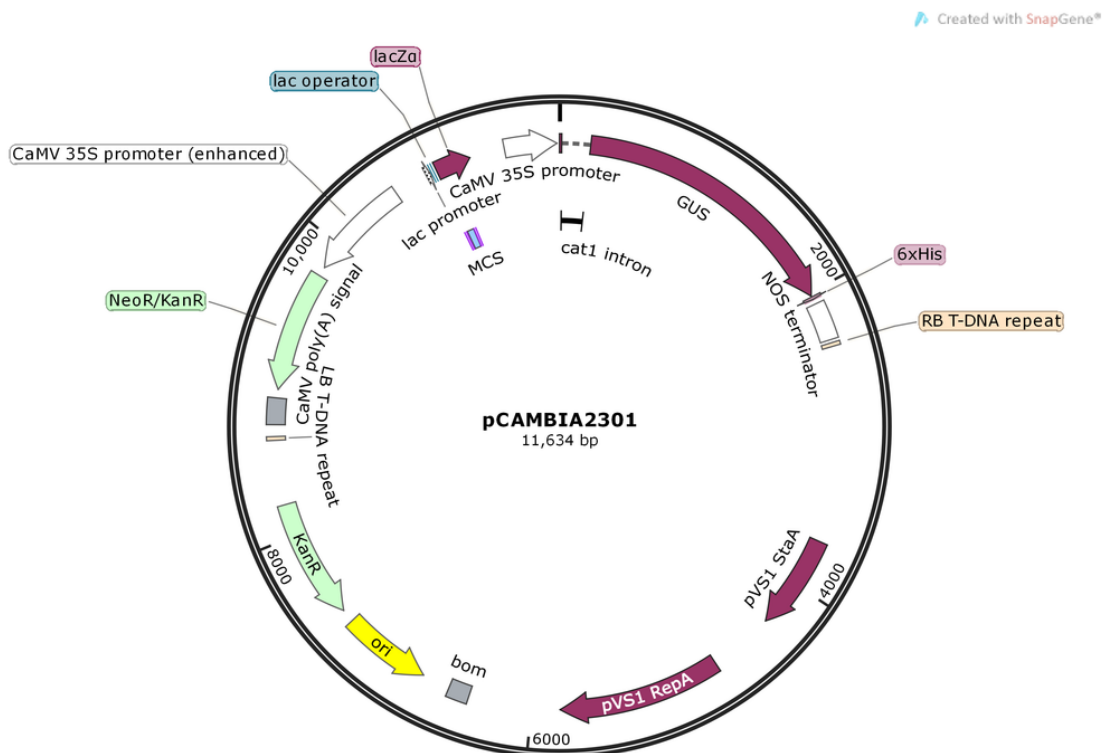


Figura 13. Mapa dos plasmídeos binários pCAMBIA1300, pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301. Nas imagens, é possível identificar os elementos dos plasmídeos esquematizados: a *ori*; o gene de seleção

de resistência frente a canamicina em bactérias (KanR); o *lac operator*; o *lac promoter*; o gene que codifica a proteína β-galactosidase (*lacZa*); a origem de replicação referente ao organismo mutante *Pseudomonas aeruginosa* resistente à vanádio (pVS1 RepA); a região de estabilidade do genoma do organismo mutante *P. aeruginosa* resistente à vanádio (pVS1 StaA); a região responsável pela mobilização do plasmídeo entre as células (BOM, do inglês, *basis of mobility*); as bordas direita (RB, do inglês, *right border*) e esquerda (LB, do inglês, *left border*) flanqueando o T-DNA também estão representadas. O T-DNA dos plasmídeos é composto por: o gene de seleção de resistência à higromicina em plantas (HygR;) ou o gene de seleção de resistência à neomicina e derivados como a canamicina em plantas (NeoR/KanR) sob regulação do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV); o MCS; o sinal de poliadenilação do vírus mosaico da couve flor - CaMV poly(A) *signal*. Além destes elementos, o vetor pCAMBIA2301 (Imagem C) contém no T-DNA: o gene repórter codificador da proteína β-glucuronidase (*GUSA*); o íntron-1 do gene codificador da proteína catalase de *Ricinus communis* (*cat1 intron*); o *tag* contendo 6 resíduos do aminoácido histidina (6xHis). As setas em preto (Imagens A e B) referem-se aos sítios de restrição das enzimas EcoRI e HindIII utilizadas nas etapas de clonagem molecular.

A seguir, para a confirmação da integridade dos cassetes gênicos ligados aos vetores pCAMBIA, as amostras de DNA plasmidiais foram sequenciadas utilizando os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse* específicos para os vetores da série pCAMBIA (Tabela 2). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene conforme citado no item 4.3.1.

#### **4.4. Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105**

Linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas geneticamente via choque térmico com os plasmídeos pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 contendo os cassetes gênicos de interesse. Paralelamente, as células de *A. tumefaciens* EHA105 também foram transformadas com o plasmídeo binário pCAMBIA2301 (Figura 13). As transformações genéticas foram realizadas seguindo o protocolo e as orientações publicadas por BRASILEIRO *et al.* (1998). As suspensões de células transformadas foram distribuídas em meio L-B sólido contendo 50 mg/L de rifampicina e 100 mg/L de canamicina com alça de Drigalski e permaneceram a 28 °C durante 48 h. As placas foram armazenadas a 4 °C até as etapas de transformação genética de plantas.

#### **4.5. Cultivo e Transformação de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Sementes de *A. thaliana* do ecotipo Columbia (col-0) foram depositadas em microtubos de 1,5 mL. Para o processo de estratificação das sementes, foi adicionado 1 mL de solução de agarose a 0,1 % autoclavada e os microtubos protegidos da luz embrulhando-os em papel alumínio e mantidos por 4 dias a 4 °C.

Posteriormente, 10 µL da suspensão de sementes foram depositados no centro e em cada uma das extremidades de copos plásticos de 300 mL contendo terra vegetal Humus (Golden Garden). Os copos foram cobertos com filme PVC por 48 h e mantidos em sala de cultivo vegetal sob condições de dias longos (16 h com incidência de luz) para germinação das sementes. Após a germinação, as mudas mais viáveis de cada copo foram selecionadas e o restante foi descartado com auxílio de uma pinça. Os copos com as plantas foram mantidos na sala de cultivo vegetal com rega frequente para o crescimento e o desenvolvimento das plantas.

Cerca de um mês e meio após o plantio, as plantas foram transformadas geneticamente pelo método de imersão de inflorescências (*floral-dip*) em suspensões de *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2300-P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub> e *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2300-P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>. Como controle das etapas de transformação genética, suspensões de *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2301 foram também utilizadas nas transformações genéticas de *A. thaliana*. Para cada construção gênica, foram transformadas aproximadamente 45 plantas. A realização do procedimento foi realizada conforme descrita em ZHANG *et al.* (2006). Após o procedimento, as plantas foram mantidas com rega frequente e permaneceram assim até a maturação das síliquas e produção de sementes.

Os procedimentos de coleta e assepsia de sementes foram realizados um mês após a transformação genética e foram conduzidos conforme descrito em ZHANG *et al.* (2006). Por fim, as sementes foram distribuídas em placas de Petri com meio MS contendo 50 mg/L de canamicina e 100 mg/L de cefotaxima. Em seguida, para o processo de estratificação das sementes, as placas foram mantidas no escuro a 4 °C durante 72 h e posteriormente transferidas para sala de cultivo vegetal sob condições de dias longos.

#### **4.6. Cultivo e Transformação de *Nicotiana tabacum White Mammoth***

As sementes de *N. tabacum White Mammoth* foram descontaminadas pela submersão em etanol a 70 % por 2 min seguida de submersão em hipoclorito de sódio (Mazzarolo) a 1,5 % de cloro ativo por 20 min. Após, as sementes sofreram 4 lavagens em água destilada estéril para a realização do processo de assepsia superficial.

Posteriormente, as sementes foram dispostas na superfície de meio MS em placas de Petri contendo metade da quantidade de sais (1/2 MS; Sigma) acrescido de ágar a 1,5 %. A seguir, as placas foram mantidas em câmara de cultivo do tipo B.O.D. à 25 °C no escuro por 48 h e, após, foram mantidas sob condições de dias longos na mesma B.O.D.

Após a 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 de caule com aproximadamente dois (2) cm de comprimento e com no mínimo duas gemas axilares em novo meio MS nas mesmas condições.

Todo o procedimento de manipulação das sementes e plantas foi realizado em cabine de fluxo laminar horizontal (PA 220, Pachane) para máxima assepsia dos tecidos.

A transformação genética de segmentos foliares de *N. tabacum White Mammoth* foram realizadas de acordo as instruções descritas por BRASILEIRO *et al.* (1998) com adaptações realizadas, conforme mencionado abaixo.

#### **4.6.1. Cocultura**

Com uso de uma alça de platina, uma colônia de cada linhagem de *A. tumefaciens EHA105* contendo alternativamente pCAMBIA2300-P<sub>COR15B-IRIP1-T<sub>nos</sub></sub>, pCAMBIA2300-P<sub>pbecl-AnAFP-T<sub>nos</sub></sub> ou pCAMBIA2301 foi inoculada em frasco Erlenmeyer com 10 mL de meio L-B líquido acrescido de 50 mg/L de rifampicina, 50 mg/L de canamicina e 100 mM de acetoseringona. As culturas foram mantidas a 28 °C sob agitação de 180 rpm durante 48 h. Um total de 100 segmentos foliares de tabaco foram preparados para cada construção gênica e posteriormente transferidos para placas de Petri contendo 25 mL de meio MS líquido. A seguir, 750 µL das culturas de *A. tumefaciens EHA105* foram adicionados nas placas de Petri contendo os segmentos foliares com o meio MS líquido. Da mesma maneira que havia sido realizado para a transformação genética de *A. thaliana*, suspensões de *A. tumefaciens EHA105::pCAMBIA2301* também foram utilizadas como controle das etapas de transformação genética de *N. tabacum*. As suspensões bacterianas foram homogeneizadas nas placas e permaneceram em repouso durante 20 min. Em seguida, com as faces adaxiais voltadas para o meio, os segmentos foliares foram transferidos para a superfície de discos de papel-filtro dispostos nas placas com meio MS de cocultivo contendo 0,1 mg/L de NAA, 1 mg/L de BAP e 100 mM de acetoseringona. As placas foram vedadas e incubadas por 72 h em câmara de cultivo do tipo B.O.D. a 25 °C.



#### **4.6.2. Indução de brotos**

Os segmentos foliares foram transferidos para placas com meio MS de seleção e regeneração contendo 0,1 mg/L de NAA, 1 mg/L de BAP, 100 mg/L de cefotaxima, 100 mg/L de vancomicina e 100 mg/L de canamicina. Para manter a eficiência dos antibióticos e reguladores de crescimento vegetal, os tecidos regenerantes foram transferidos para novos meios de seleção e regeneração após um mês de cultivo.

#### **4.6.3. Alongamento e enraizamento**

Os brotos regenerados após 9 semanas de cultura foram removidos com auxílio de pinça e bisturi e transferidos para placas de Petri com meio MS de enraizamento contendo 100 mg/L de cefotaxima, 100 mg/L de vancomicina e 100 mg/L de canamicina. Nenhum regulador de crescimento vegetal foi incluído neste meio.

#### **4.7. Extração de DNA de *N. tabacum White Mammoth***

As extrações de DNA de folhas de plantas regeneradas de *N. tabacum White Mammoth-GUSA* e *N. tabacum White Mammoth-P<sub>pbcI</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>* foram realizadas utilizando o método do brometo de cetiltrimetilamônio ou CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). Dois µL de cada amostra de DNA purificada foram aplicados em gel de agarose a 0,8% e corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA conforme citado em 4.3.1 para confirmação da quantidade e integridade do DNA.

#### **4.8. Confirmação da presença de P<sub>pbcI</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub> e T-DNA de pCAMBIA2301 no genoma de *N. tabacum White Mammoth* por PCR**

A PCR para confirmação da integração de *GUSA* e *P<sub>pbcI</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>* no genoma de *N. tabacum White Mammoth* foi realizada utilizando-se termociclador LGC (XP Cyclor). O programa da reação está representado na Tabela 3. Os componentes e quantidades da PCR foram; água ultrapura (36 µL); 5x Green GoTaq Flexi Buffer (5 µL; promega); 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (2 µL); 5 mM de dNTP's, do inglês, *deoxynucleotide triphosphates* (2 µL); *primer* M13 (-21) *Forward* (2 µL); *primer* M13 *Reverse* (2 µL); GoTaq Start DNA *polymerase* (0,5 µL; promega); DNA molde extraído de folha (0,5 µL). Foram aplicados 10 µL dos *amplicons* resultantes em gel de agarose a 0,8% e corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h à 65 mA conforme citado em 4.3.1.

**Tabela 3. Programa do termociclador para PCR de confirmação da presença de *GUSA* e  $P_{pbec1}$ -*AnAFP-T<sub>nos</sub>* no genoma de *N. tabacum White Mammoth*.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	35
Anelamento	46	30 s	35
Extensão	72	4 min	35
Extensão final	72	15 min	1

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Definição de Cassetes Gênicos com Potencial Capacidade de Conferir a Tolerância Vegetal ao Frio e/ou ao Congelamento**

Com vistas à definição de cassetes gênicos com potencial capacidade de conferir a tolerância vegetal ao frio e/ou ao congelamento, uma robusta busca bibliográfica foi realizada por artigos científicos onde tenha sido descrito a aquisição de maior tolerância de plantas transgênicas a estes estresses. Buscas também foram realizadas por sequências promotoras capazes de direcionar a expressão de genes repórteres em plantas transgênicas em resposta ao frio. Como resultados, foram selecionadas regiões promotoras responsivas ao frio e/ou ao congelamento e potenciais sequências codificadoras de proteínas. Nas Tabelas 4 e 5 estão indicadas algumas destas sequências, analisadas ao longo da busca bibliográfica. Devido às acentuadas induções da transcrição de genes repórteres em condições de baixas temperaturas em comparação com os demais promotores analisados, foram escolhidas as sequências promotoras  $P_{pbec1}$  e  $P_{Cor15B}$  descritas por TITTARELLI *et al.* (2009) e LI *et al.* (2013) e derivados de *Prunus persica* e *A. thaliana*, respectivamente. O gene *Cor15B* codifica a proteína regulada pelo frio (proteína *Cor*, do inglês, *cold regulated protein*) e é expresso em condições de baixas temperaturas. As proteínas do tipo *Cor* podem conferir tolerância a estresses abióticos, inclusive ao frio, possivelmente interagindo com lipídeos para promover a estabilização de membranas celulares (THALHAMMER *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013). De

acordo com LI *et al.* (2013), em plantas de tabaco transgênicas, a expressão do gene repórter *GUSA* a 4 °C sob regulação do promotor  $P_{Cor15B}$  teve um aumento significativo, comparando-se com plantas expostas a 20 °C, em folhas, caules e raízes. O gene *pbec1* codifica uma proteína do tipo endoquitinase básica que é acumulada nas plantas em condições de baixas temperaturas. A acumulação destas proteínas nos tecidos vegetais pode ser explicada como um mecanismo de prevenção ao estresse biótico, devido à vulnerabilidade das plantas a patógenos sob condições de temperaturas mais frias (HON *et al.*, 1993; TITTARELLI *et al.*, 2009). Segundo TITTARELLI *et al.* (2009), em plantas de *A. thaliana* transgênicas, a expressão do gene repórter *GUSA* a 4 °C sob regulação do promotor  $P_{pbec1}$  teve um significativo aumento em comparação com plantas expostas a 24 °C. As sequências codificadoras escolhidas foram as dos genes *AnAFP* e *IRIP1* descritas por YU *et al.* (2009) e JOHN *et al.* (2009) e derivados de *Ammopiptanthus nanus* e *Deschampsia antarctica*, respectivamente. De acordo com DENG *et al.* (2014), a expressão heteróloga do gene *AnAFP* em *E.coli* foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência das bactérias em condições de cultivo a 0 °C. Além disto, ainda de acordo com DENG *et al.* (2014), a expressão constitutiva de *AnAFP* sob regulação do promotor viral 35S em tabaco tornou as plantas transgênicas tolerantes ao frio e sem qualquer dano tecidual visualizado em condições de incubação a -3 °C durante 3 h de exposição. Segundo CHEW *et al.* (2012), o gene *IRIP1* está envolvido com o processo de aclimação ao frio nas plantas de *D. antarctica* e também com atividades anticongelantes diretamente relacionadas com a obtenção da tolerância ao frio e/ou ao congelamento em plantas. Ambas as sequências gênicas *AnAFP* e *IRIP1* codificam proteínas caracterizadas como AFPs e estas possuem envolvimento com a tolerância nestas condições de estresse. As sequências gênicas escolhidas foram agrupadas em dois cassetes, em conjunto com a sequência terminadora 3'-nos derivada do gene da *nopalina sintase* de *A. tumefaciens*. Os cassetes gênicos de expressão foram nomeados de  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  (1,6 kb) e  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  (2,1 kb). Conforme descrito na seção Materiais e Métodos, as sequências promotoras selecionadas foram combinadas com as sequências codificadoras e o terminador 3'-nos, construindo-se sequências sintéticas conforme ilustrado na Figura 14. Após a inclusão e remoção de sítios estratégicos de restrição para realização de diversas clonagens, as sequências foram enviadas à empresa GenScript (EUA) para síntese química. As mesmas foram retornadas ligadas ao vetor plasmidial pUC57 (GenScript).

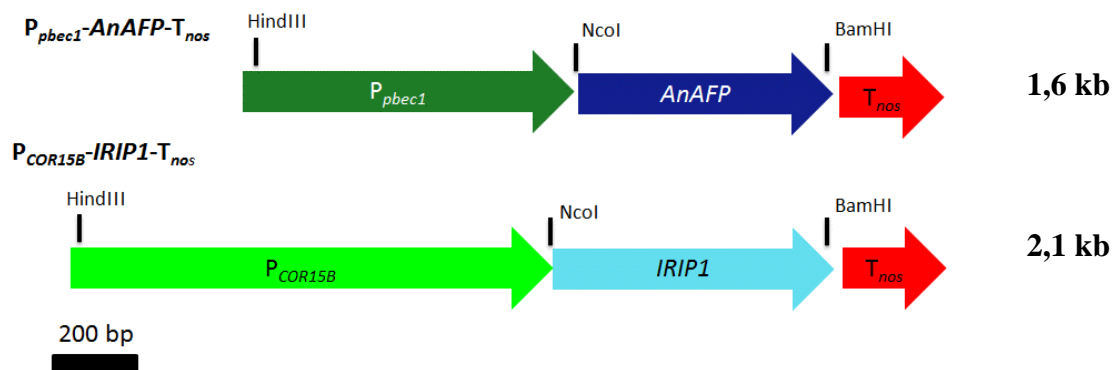
**Tabela 4. Sequências codificadoras de proteínas analisadas capazes de conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento.**

<b>Gene</b>	<b>Espécie de Origem</b>	<b>Acesso (GenBank)</b>	<b>Referência</b>
<i>COR25</i>	<i>Brassica napus</i>	HM187577.1	(CHEN <i>et al.</i> , 2010)
<i>TaDREB3</i>	<i>Triticum aestivum</i>	AY781349.1	(KOVALCHUK <i>et al.</i> , 2013)
<i>IRIP1</i>	<i>Deschampsia Antarctica</i>	FJ663038.1	(CHEW <i>et al.</i> , 2012)
<i>PR10</i>	<i>Pinus monticola</i>	AY064202.1	(LIU <i>et al.</i> , 2013)
<i>AnAFP</i>	<i>Ammopiptanthus nanus</i>	GQ200581.1	(DENG <i>et al.</i> , 2014)
<i>MpAFP14</i>	<i>Microdera punctipennis dzungarica</i>	AY821792.1	(QIU <i>et al.</i> , 2009)
<i>Cn-AFP</i>	<i>Chaetoceros neogracile</i>	FJ595233.1	(GWAK <i>et al.</i> , 2009)

**Tabela 5. Sequências promotoras capazes de induzir transcrição em condições de baixas temperaturas.**

Gene	Espécie de Origem	Acesso (GenBank)	Referência
<i>COR15B</i>	<i>A. thaliana</i>	NC_003071.7	(LI <i>et al.</i> , 2013)
<i>OsDREB1B</i>	<i>Oryza sativa</i>	EF556551	(GUTHA <i>et al.</i> , 2008)
<i>GR-RBP4</i>	<i>A. thaliana</i>	NC_003074.8	(KWAK <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ppbec1</i>	<i>Prunus persica</i> var <i>persica</i> (L.)	_____	(TITTARELLI <i>et al.</i> 2009)
<i>TaAIDFa</i>	<i>Triticum aestivum</i> L.	_____	(XU <i>et al.</i> 2008)

Nota: As regiões promotoras que não contém o código de acesso estão descritas nos artigos citados como referência.



**Figura 14. Representação das sequências gênicas organizadas em dois cassetes de expressão  $P_{pbec1}$ -AnAFP- $T_{nos}$  e  $P_{COR15B}$ -IRIP1- $T_{nos}$ .** Estão indicados na Figura os sítios de reconhecimento e hidrólise das enzimas de restrição NcoI e BamHI inseridos sobre a sequência ATG do sítio de início de tradução e após o códon de terminação da tradução, respectivamente. Além disto, na imagem também estão indicados os sítios de HindIII na extremidade 5' de ambos os cassetes gênicos. Ao lado da representação, estão indicados os tamanhos de cada cassete gênico.

## 5.2. Análises *in Silico* de Elementos de DNA *Cis*-atuantes nas Regiões Promotoras P<sub>pbec1</sub> e P<sub>COR15B</sub>

As análises *in silico* das sequências nucleotídicas dos promotores P<sub>pbec1</sub> e P<sub>COR15B</sub> utilizando-se a ferramenta *SOGO* revelaram a presença de diversos elementos de DNA *cis*-atuantes. Como indicado na Figura 15, as duas regiões promotoras compartilham os mesmos elementos regulatórios em respostas a estresses abióticos. Entre as sequências compartilhadas, destacam-se:

- Sítios de reconhecimento das proteínas MYB (MYBRS, do inglês, *MYB Recognition Sequence*) e MYC (MYCRS, do inglês, *MYC Recognition Sequence*). As proteínas da família MYB e MYC são fatores de transcrição e estão relacionadas com respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas (ABE *et al.*, 1997). Estes fatores de transcrição estão envolvidos na ativação de genes de repostas às baixas temperaturas e em conferir tolerância ao congelamento em plantas (CHINNUSAMY *et al.*, 2003; AGARWAL *et al.*, 2006).
- Elementos de resposta ao ácido abscísico (ABRE, do inglês, *abscisic acid response element*). As regiões ABRE são sítios de ligação de fatores específicos, nomeados de ABF (do inglês, *ABRE-binding factor*; YOSHIDA *et al.*, 2015). Estes fatores são regulados de acordo com os níveis do fitormônio ABA no interior da célula vegetal. Durante o déficit de água ou desidratação, o qual pode ser um efeito causado pelo congelamento em plantas, o ABA desencadeia cascatas de sinalização celular. Desta maneira, os ABFs tornar-se-iam ativados para regular genes de resposta à desidratação vegetal (YIN *et al.*, 2015).
- Elementos de respostas às baixas temperaturas (LTRE, do inglês, *low temperature responsive element*). As regiões LTRE, também conhecidas como elementos de respostas à desidratação (DRE, do inglês *dehydration responsive element*) são sequências regulatórias presentes em promotores de genes responsivos às baixas temperaturas. Estas regiões são sítios de ligação para a família de fatores de transcrição chamadas de CBF/DREB (do inglês, *C-repeat binding factor* e *dehydration responsive element binding*). Estes fatores regulam e ativam os genes a montante nas vias de respostas ao frio (AGARWAL *et al.*, 2006)

Deste modo, por conter diversos elementos *cis*-atuantes de DNA em resposta a estresses abióticos e de acordo com o aumento da expressão gênica de genes repórteres em condições de baixas temperaturas conforme mencionado anteriormente e descrito por TITTARELLI *et al.* (2009) e LI *et al.* (2013), podemos chegar à conclusão de que as sequências promotoras P<sub>pbec1</sub> e P<sub>COR15B</sub> são responsivas às baixas temperaturas.

A)

**Promotor P<sub>pbec1</sub> (5' - 3')**

AGCTTGTGATTTCAAACAGTTCCCGTTACCCACGTA<sup>1</sup>AACTGATATATCCTCTGATATT

**MYBRS ABRE**

TTCTTTTTCCTGTAGGCAGACATATTTTACATAGACAAAATAAAAAGTTTCAAATACA

TAGAGAGTTCTGTGTGAGCGAAAGATAAGAATCTATGACAAGAATAAAACAAAGAAGTA

AGAAATAGTAAGAAAATTATACTACTGGGGTAACTTTGATCAGTCACATTCACCTTGAT

TTCTATAGACTTGGTTAAAGAAGAGATATTCAAAGCACGACTAAGTCTCTAGTTCTAG

**MYBRS**

GTCTGCACTATTCCTGCCCTTATCCTTCAATTTTGAGATTTCAATCGACTGACGTGTTTC

**MYBRS DRE ABRE**

TGAGGCGAGCTATTCAATCCGTACGCAAAC<sup>2</sup>TTTTCAGATATTTTCCAGCAGCCTGTCCA

AATACACCGTCACTAAAATAACCCTCTTGTGCAATTTCCACAAC<sup>3</sup>TAAACAAACTTAGA

AGAAAAAGCAAATACAATTAATGGGGTGGGTACTTTGCCAATTTGAGAAGGGTCATGC

TAGGGAGACCAACTTTAGATACCAACTCTCTAATAGAGGTGAAGCCCACCAATACAATG

GGTCCCACACTCTATTAGAGAGTTGACACACAAAT<sup>4</sup>TGGTATCTAAAATTGTTCTCCCTA

GCATTTTCCATTTGAGAAAGGAATAGTCAAACAAAAACGCTCCTCGCTAAGCTATATAT

**MYCRS TATA BOX**

ACACATCCCCACGAAACCCAATCCACAGATCC

B)

**Promotor P<sub>COR15B</sub> (5' - 3')**

AGCTTTAAATAATGAGTAATTATAAGTAACATCGCCGTCTAGAGTCTTTCAACGGTGAA

**MYBRS**

AGGATGAGAGCATATGGGAGATCGATAGCCTTGTCTCTTTTGTGACGAACCAATAAAAG

**MYCRS**

AGGAACTGCTTTTTTTCTTCGCATGTCCACTATTTACTGTTTGGTATGACATCGAATTG

GTATGATACATTGTTGTACCAAAAAC<sup>1</sup>TTCAAATTTGGTGGCTTGTAAATCAACATTGAT

CCACTTAGCCATTCCAAGCAGTGAATTACAATCCGTGGAAGGAAAAATTATGGTCCGGC

ACCAACAAATTATCACCTCATCTCCCGTCACAAACATATCATCTAGAAGTCCGGTATGCC

**DRE**

ACACCACATAATTAAGGAGCACATTACTCACATACCCAACCAATGTGGGACATATCTAA  
 TAAGCTCATTCTTGGCTGGTACATGCTCTATTTTCATATTTATCAAAAAAAAAAATATTA  
 GGCATTGTAAATAGCGTTTTTGCTGTTGAGCAAAATAGTTATATTTGAAAGTAACATTG

**MYBRS**

GTATTTATAATTATAGTATAACAATTAGGCATTGAAGTGTGAGTTTTTGTTTTTGTTTA  
 TTTAACATTGGAGTATTAGGTTCTTAGAAATATATCTATATACTATTAGTAGTTTAACT  
 ACAGTTTGTACTTAATTGAAAAAATGTTAAAAGTTGTTTTAACCTAGCTAATTGCTAAA  
 AATGACTAAATAGACATACACAAAGACTTGTACATTTTCAGCTTAACGACTAATACATT  
 TTTCTTTATATATATATCTCTATCGAGTCTAGTTATTAATGTTGAAAGTTGCAAATAA  
 AACAGAAATGCTAACATGTAAATATCGTAGCCAAAAATGCTAACATGTGTATAACGGTT

**MYCRS**

**MYBRS/ MYBRS**

ATAACCACAACTTGATGGCCGACCTCTTTTTCTTTTGGTTAACCATAGAAATGGTTACA

**MYBRS**

**DRE**

**MYBRS**

**ABRE**

CGTAACTAGTACGAACCAACGAAACTCTTCTTATTCGATAGTTAAAGATAATAGCAAT  
GCGCAAAAATATCTAGCACTCACACGTGTAGTTTTGGATTCTCATTGGTCGAGAGATC

**ABRE/MYCRS**

TATAAAACGATACTATTGGAGGTTAGATTTTTCTCATCTCACTTTCTCCATCTTAAAC

**TATA BOX**

TCTTTCTTGTATTTATTTTCTCCCAAAAACATCTTTAAGAGTCCGGATCTCCC

**Figura 15. Representações das sequências nucleotídicas dos promotores  $P_{pbec1}$  (A) e  $P_{Cor15B}$  (B) com os elementos de DNA *cis*-atuantes.** As regiões sublinhadas são os elementos de DNA *cis*-atuantes em resposta a estresses abióticos. A região referente ao *TATA box* está também destacada.

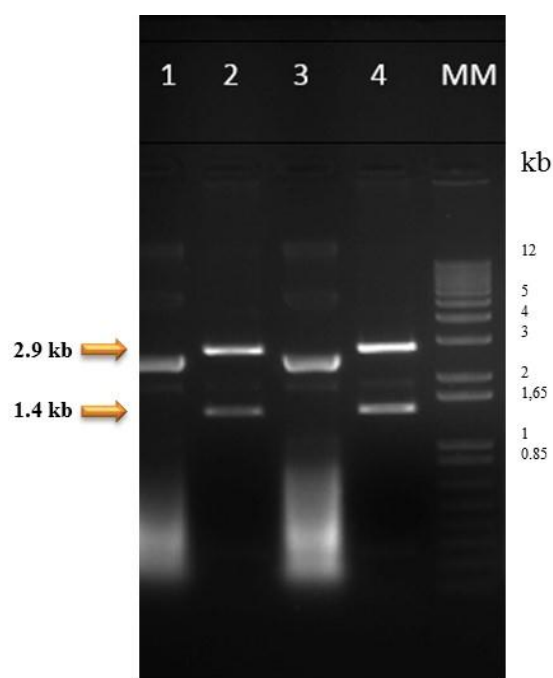
**5.3. Confirmação da Integridade dos Cassetes Gênicos no Vetor Plasmidial pUC57**

Os plasmídeos pUC57 contendo os cassetes  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  enviados pela empresa *GenScript*, como citado no item 4.3.1, foram utilizados para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2* para clonagem. Diversas colônias selecionadas com o antibiótico ampicilina, específico para pUC57, foram

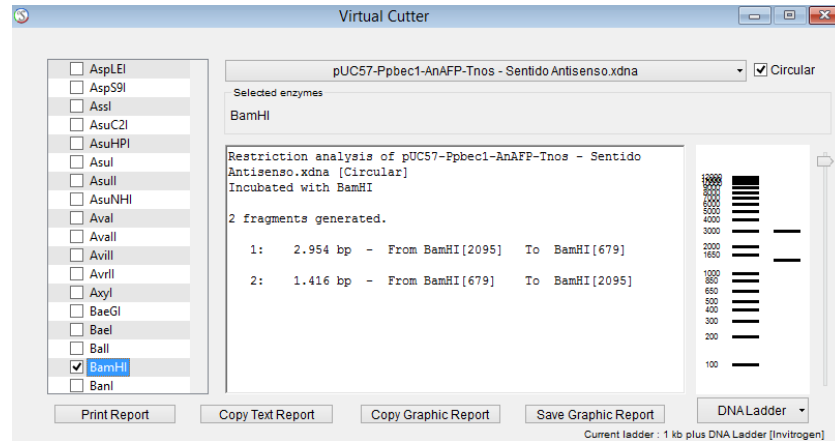


obtidas. Posteriormente, 5 colônias de pUC57-*P<sub>COR15B-IRIP1</sub>-T<sub>nos</sub>* e 2 colônias de pUC57-*P<sub>pbc1-AnAFP</sub>-T<sub>nos</sub>* foram inoculadas para a preparação de plasmídeo pelo método de lise alcalina e posteriores reações de hidrólise com a enzima BamHI. É possível visualizar, de acordo com as Figuras 16 e 17, padrões de fragmentos de DNA hidrolisados (2,9 e 1,4 kb) semelhantes aos padrões de bandas teóricas do vetor pUC57 contendo os cassetes gênico de interesse e hidrolisados *in silico* com a enzima BamHI.

A)

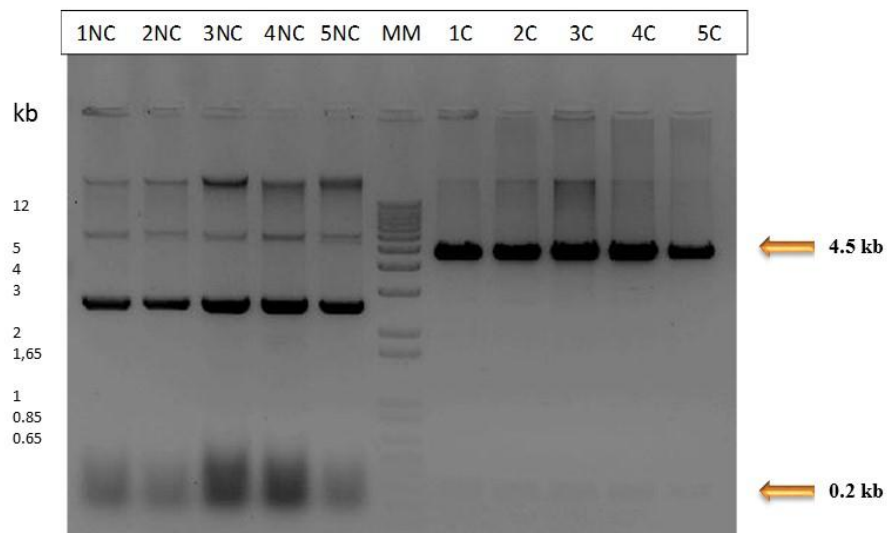


B)

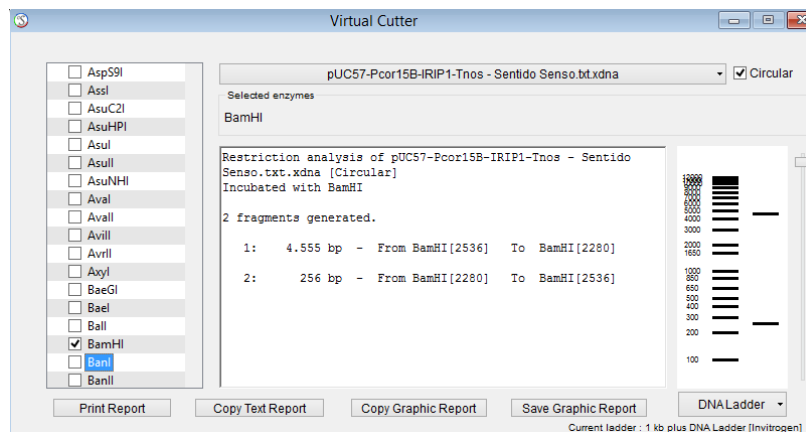


**Figura 16. Fragmentos de DNA de pUC57-  $P_{pbc1}$ -AnAFP-T<sub>nos</sub> hidrolisadas com a enzima BamHI. Imagem (A): Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de amostras de DNA plasmidial pUC57- $P_{pbc1}$ -AnAFP-T<sub>nos</sub> hidrolisadas com a enzima de restrição BamHI (2 e 4) e não hidrolisadas (1 e 3). Imagem (B): Padrões de bandas teóricos do vetor plasmidial pUC57- $P_{pbc1}$ -AnAFP-T<sub>nos</sub> hidrolisado *in silico* com a enzima BamHI utilizando-se a ferramenta *Serial Cloner 2.6.1*. As flechas em cor laranja (Imagem A) referem-se aos tamanhos de fragmentos de DNA esperados (2,9 e 1,4 kb). Conforme indicado na Imagem B, os fragmentos esperados deveriam ser de 2.954 e 1.416 pb (bp na Figura). MM, Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).**

A)



B)

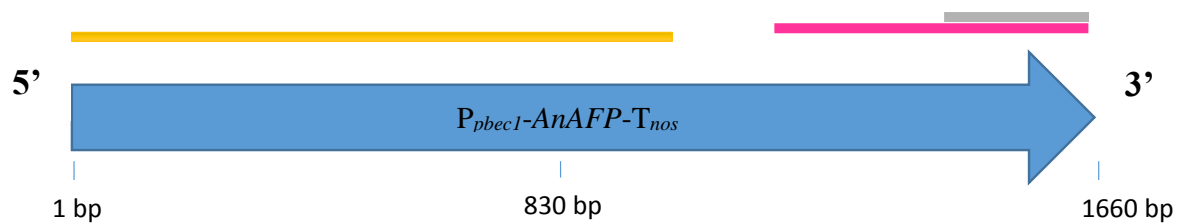


**Figura 17. Fragmentos de DNA de pUC57- P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub> hidrolisadas com a enzima BamHI. Imagem (A): Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de amostras de DNA plasmidial pUC57- P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub> hidrolisadas com a enzima de restrição BamHI (1C-5C) e não hidrolisadas (1NC-5NC). Imagem (B): Padrões de bandas teóricos do vetor plasmidial pUC57-P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub> hidrolisados *in silico* com a enzima BamHI utilizando a ferramenta Serial Cloner 2.6.1. As flechas em cor laranja (Imagem A) referem-se aos tamanhos de fragmentos de DNA esperados (4.5 e 0.2 kb). Conforme indicado na Imagem B, os fragmentos esperados deveriam ser de 4.555 pb e 256 pb (bp na Figura). MM: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)**







A confirmação da integridade dos cassetes gênicos foi realizada por sequenciamento de DNA utilizando os *primers* específicos indicados na Tabela 2. Na Figura 18 estão demonstradas as regiões cobertas pelos sequenciamentos de DNA. Os alinhamentos utilizando a ferramenta BLAST permitiram demonstrar, para ambos os cassetes gênicos, um alto grau de identidade (92-99%) comparando-se com as sequências originais, confirmando integridade dos cassetes gênicos no vetor pUC57 (dados não mostrados). Houve uma exceção referente à região de pUC57-P<sub>pbcI-AnAFP</sub>-T<sub>nos</sub> sequenciada utilizando-se o *primer reverse* AnAFP-259/241 (identidade de 81%). O grau de identidade inferior atribuído à sequência amplificada com o *primer reverse* AnAFP-259/241 pode ser devido ao anelamento do *primer* em outras regiões internas da sequência de *AnAFP*.

A)

### Sentido *Forward*

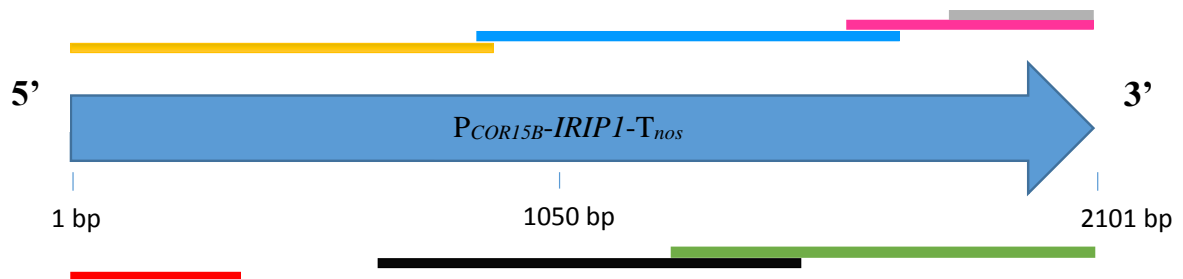


### Sentido *Reverse*








-  Produto sequenciado com o *primer*  $P_{PBEC1}$ -Forward
-  Produto sequenciado com o *primer* AnAFP-380/399-Forward
-  Produto sequenciado com o *primer* T<sub>NOS</sub> 30/48-Forward
-  Produto sequenciado com o *primer*  $P_{PBEC1}$ -234/209-Reverse
-  Produto sequenciado com o *primer* AnAFP-380/399-Forward
-  Produto sequenciado com o *primer* T<sub>NOS</sub>-Reverse

B)

### Sentido *Forward*



### Sentido *Reverse*

-  Produto sequenciado com o *primer* P<sub>COR15B-Forward</sub>
-  Produto sequenciado com o *primer* P<sub>COR15B-933/954-Forward</sub>
-  Produto sequenciado com o *primer* IRIP1-446/469-Forward
-  Produto sequenciado com o *primer* T<sub>NOS</sub> 30/48-Forward
-  Produto sequenciado com o *primer* P<sub>COR15B-245/224-Reverse</sub>
-  Produto sequenciado com o *primer* IRIP1-229/213-Reverse
-  Produto sequenciado com o *primer* T<sub>NOS-Reverse</sub>

**Figura 18. Representação da cobertura dos dados dos sequenciamentos de DNA ao longo dos cassetes gênicos  $P_{pbecI-AnAFP-T_{nos}}$  (A) e  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  (B).** As barras acima e abaixo das representações esquemáticas dos cassetes gênicos representam as regiões sequenciadas nos sentidos *Forward* e *Reverse*, respectivamente. É possível observar que as regiões sequenciadas foram capazes de cobrir por inteiro ambos os cassetes gênicos em pelo menos uma orientação e quase que por completo na orientação contrária.

#### 5.4. Isolamento dos Cassetes Gênicos do Vetor pUC57 e Ligação nos Vetores Binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300

Os cassetes gênicos  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  foram isolados do vetor pUC57 via reação de hidrólise utilizando as enzimas de restrição HindIII e combinação entre HindIII e EcoRI. Os fragmentos correspondentes foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose e purificados. Como indicado na Figura 19, apenas bandas de fragmentos de DNA com tamanhos de 2,1 e 1,6 kb foram visualizadas nas amostras AM5 e AM6, respectivamente. Portanto, como os cassetes gênicos continham exatamente estes tamanhos, foi confirmado o êxito nas reações de clivagem e purificação de  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ . Em paralelo, os vetores pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 foram hidrolisados com as mesmas enzimas citadas acima. As extremidades dos vetores foram desfosforiladas com a enzima fosfatase alcalina de forma a impedir a religação dos mesmos. Os fragmentos de DNA correspondentes aos tamanhos dos dois vetores binários linearizados, conforme visualizados nas amostras AM1-AM4 da Figura 19, demonstraram a integridade destes.

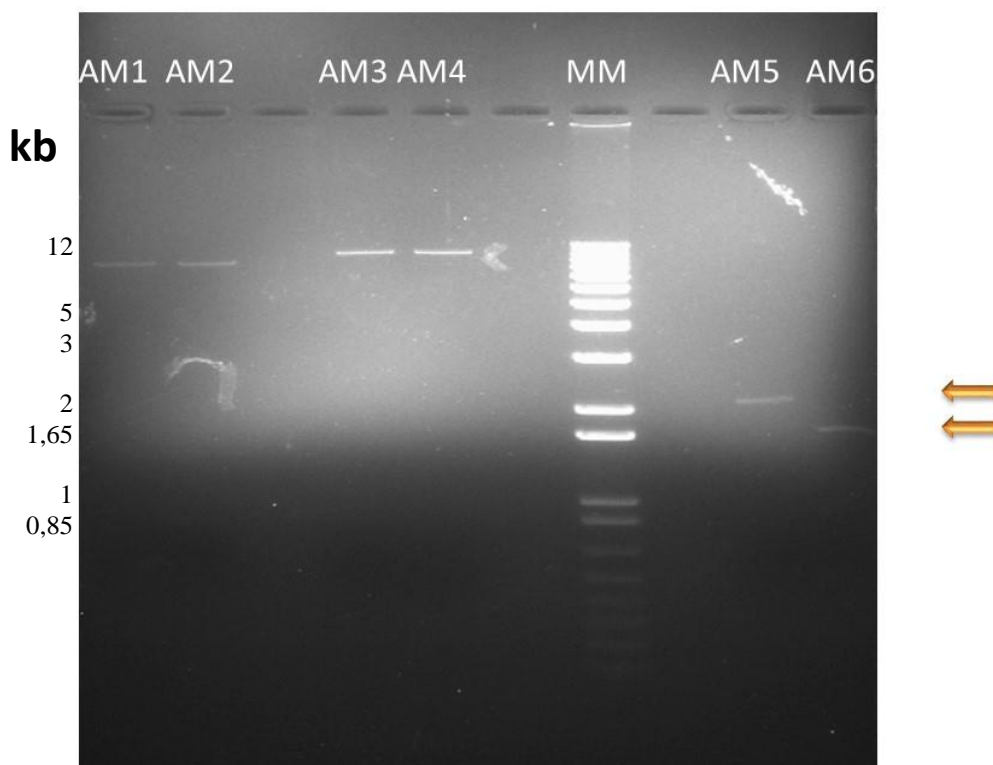
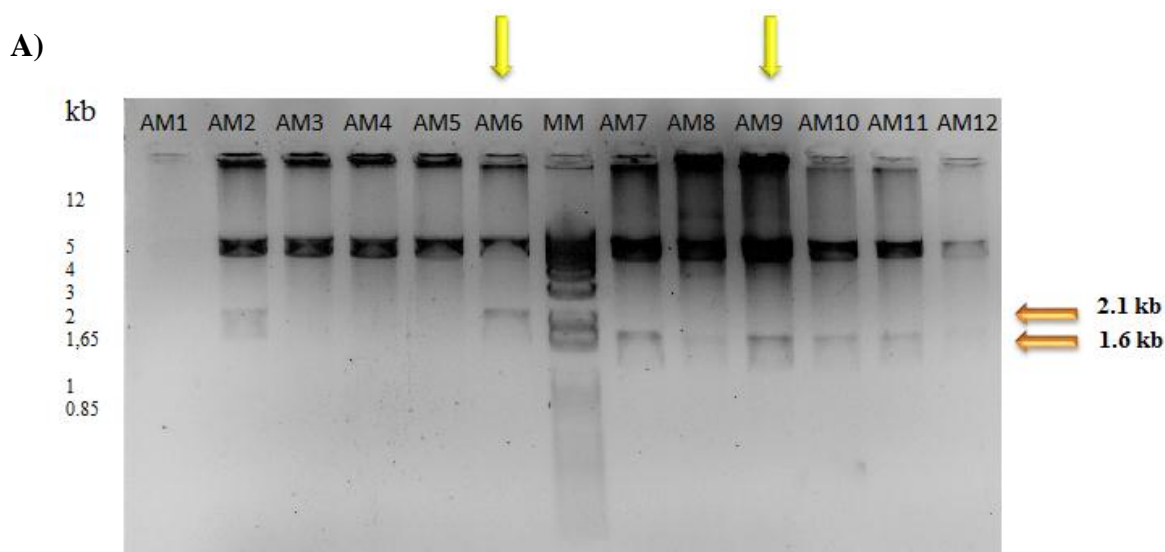


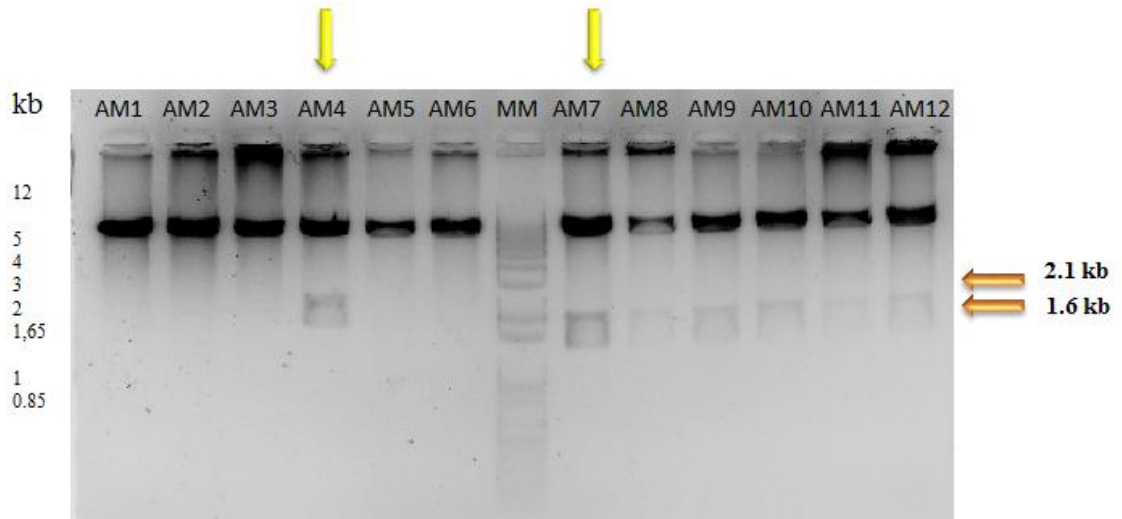
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de pCAMBIA1300 (AM1 e AM2) e pCAMBIA2300 (AM3 e AM4) e cassetes gênicos  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  (AM5) e  $P_{COR15B-IRIP1-T_{nos}}$  (AM6) purificados de pUC57 (GenScript). As amostras foram hidrolisadas pela enzima HindIII

(AM1, AM3 e AM5) ou com a combinação de HindIII e EcoRI (AM2, AM4 e AM6). MM, marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). As setas em cor laranja apontam para os fragmentos de 2,1 e 1,6 kb relativos aos cassetes gênicos  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  e  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$ , respectivamente.

Os cassetes gênicos  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  e  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  purificados de gel foram ligados aos vetores pCAMBIA utilizando a enzima T4-DNA Ligase. Os produtos das reações de ligações foram utilizados para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2*. Foram obtidas diversas colônias selecionados com o antibiótico canamicina, marca de seleção em bactérias específica para os plasmídeos pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300. Posteriormente, seis colônias de cada linhagem transformada foram inoculadas em meio L-B para a preparação de plasmídeos pelo método de lise alcalina e posterior reações de hidrólise com a enzima HindIII e a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI. Foi possível visualizar, de acordo com a Figura 20, duas colônias (Imagem A: AM2 e AM6) e uma colônia (Imagem B: AM4) com fragmentos de DNA com tamanhos relativos ao cassete gênico  $P_{COR15B-IRIPI-T_{nos}}$  (2,1 kb). Ainda de acordo com a Figura 20, foi possível visualizar (Imagem A e Imagem B) fragmentos de DNA com tamanhos relativos ao cassete gênico  $P_{pbec1-AnAFP-T_{nos}}$  (1,6 kb) em todas as colônias preparadas (AM7-AM12).



B)



**Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de amostras de pCAMBIA1300- $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (Imagem A: AM1 a AM6) , pCAMBIA1300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (Imagem A: AM7 a AM12), pCAMBIA2300- $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (Imagem B: AM1 a AM6) e pCAMBIA2300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (Imagem B: AM7 a AM12). As amostras foram hidrolisadas pela enzima HindIII (AM1-AM6) ou com a combinação de HindIII e EcoRI (AM7-AM12). MM: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As setas em laranja indicam bandas de DNA referentes aos cassetes gênicos  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (1,6 kb) e  $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (2,1 kb). As setas em amarelo indicam os plasmídeos recombinantes positivos selecionados e cujas seqüências foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

Para a confirmação da ligação dos cassetes gênicos aos vetores pCAMBIA, as amostras pCAMBIA1300- $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (Figura 21: AM6 na Imagem A), pCAMBIA1300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (Figura 21: AM9 na Imagem A), pCAMBIA2300- $P_{COR15B}$ -*IRIPI*- $T_{nos}$  (Figura 21: AM4 na Imagem B) e pCAMBIA2300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (Figura 21: AM7 na Imagem B) foram sequenciadas nas extremidades 5' e 3' com o uso dos *primers* M13 (-21) *Forward* e M13 *Reverse* (Tabela 2). Todas as amostras sequenciadas com o *primer* M13 *Reverse* apresentaram alto grau de identidade (97-98%) quando alinhadas com as seqüências originais (resultados não apresentados). Entretanto, possivelmente devido à contaminação ou degradação do *primer*, todas as amostras sequenciadas com M13 (-21) *Forward* não apresentaram resultados inteligíveis (dados não mostrados). Apesar disto, devido à visualização das bandas de DNA com tamanhos relativos aos cassetes gênicos em gel de agarose após eletroforese e o alto grau de identidade obtido nas amostras sequenciadas com o *primer* M13 *Reverse*, concluiu-se que



os cassetes gênicos foram inseridos com sucesso nos vetores pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300.

### 5.5. Transformação Genética de *A. tumefaciens* EHA105 com os Plasmídeos Binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 Contendo os Cassetes Gênicos

As transformações dos plasmídeos binários pCAMBIA1300 e pCAMBIA2300 contendo os cassetes gênicos em células de *A. tumefaciens* EHA105 foram realizadas por choque térmico e resultaram em diversas colônias selecionadas com o antibiótico canamicina. Além destas, foram obtidas também colônias selecionadas com o antibiótico canamicina para *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2301 para emprego como controle positivo de transformação. Uma única colônia de cada linhagem transformada foi selecionada para as posteriores etapas de transformação genética de plantas.

### 5.6. Cultivo e Transformação Genética de Plantas de *A. thaliana* col-0 com Linhagens de *A. tumefaciens* EHA105

As plantas de *A. thaliana* col-0 foram transformadas geneticamente pelo método de *floral-Dip* em suspensões de células de *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2300- $P_{pbc1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ , *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2300- $P_{COR15B}$ -*IRIP1*- $T_{nos}$  e *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2301 conforme descrito no item 4.5. Na Figura 21 estão exibidas as plantas de *A. thaliana* dois dias após o processo de transformação. Aproximadamente, foram transformadas 45 plantas para cada construção gênica. As sementes foram coletadas e, no atual estado, estão em processo de seleção com o antibiótico canamicina.



Figura 21 Plantas de *A. thaliana* col-0 2 dias após a transformação genética pelo método de *floral-Dip* com suspensões de células de *A. tumefaciens* EHA105 contendo pCAMBIA2301,

**pCAMBIA2300-*P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>* ou pCAMBIA2300-*P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub>*.** Sementes destas plantas foram coletadas e encontram-se sob seleção em meio com canamicina para identificação de linhagens transgênicas T<sub>1</sub>.

### **5.7. Cultivo e Transformação Genética de Plantas de *N. tabacum* White Mammoth com Linhagens de *A. tumefaciens* EHA105**

A transformação genética de segmentos foliares de *N. tabacum* White Mammoth foi realizada conforme descrito no item 4.6. Segundo BRASILEIRO *et al.* (1998), os primeiros brotos resistentes ao agente de seleção deveriam surgir 3 ou 4 semanas após o cocultivo com as agrobactérias. Entretanto, durante este período, não foram visualizadas quaisquer formações de brotos e as únicas alterações observadas nos discos foliares foram a expansão de seus tamanhos, possivelmente devido à hidratação e aos reguladores de crescimento do meio MS, com a formação de tecidos vegetais amorfos e vitrificados. Para manter a eficiência dos reguladores de crescimento e a pressão seletiva dos antibióticos, os tecidos foram transferidos para novos meios de seleção e regeneração após um mês de cultivo.

Somente após 9 semanas em processo de regeneração e seleção, um broto referente à construção gênica pCAMBIA2300-*P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>* e um broto referente à construção gênica pCAMBIA2301 resistentes ao agente de seleção começaram a surgir. Os brotos foram transferidos para frascos individuais contendo meio de enraizamento sem os reguladores de crescimento NAA e BAP, como citado no item 4.6.3. De um total de 300 segmentos foliares (100 para cada construção gênica), apenas 2 brotos foram recuperados. Destes 300 segmentos, aproximadamente 60 segmentos foram descartados por contaminação com traços de *A. tumefaciens*. Deste modo, o processo de transformação genética de discos foliares de *N. tabacum* foi pouco eficiente e, sendo assim, deverá ser repetida e otimizada visando-se uma eficiência maior. Na Figura 22 está esquematizado o processo de regeneração dos segmentos foliares em plantas de *N. tabacum*. As duas plantas regeneradas podem ser visualizadas na Figura 23.

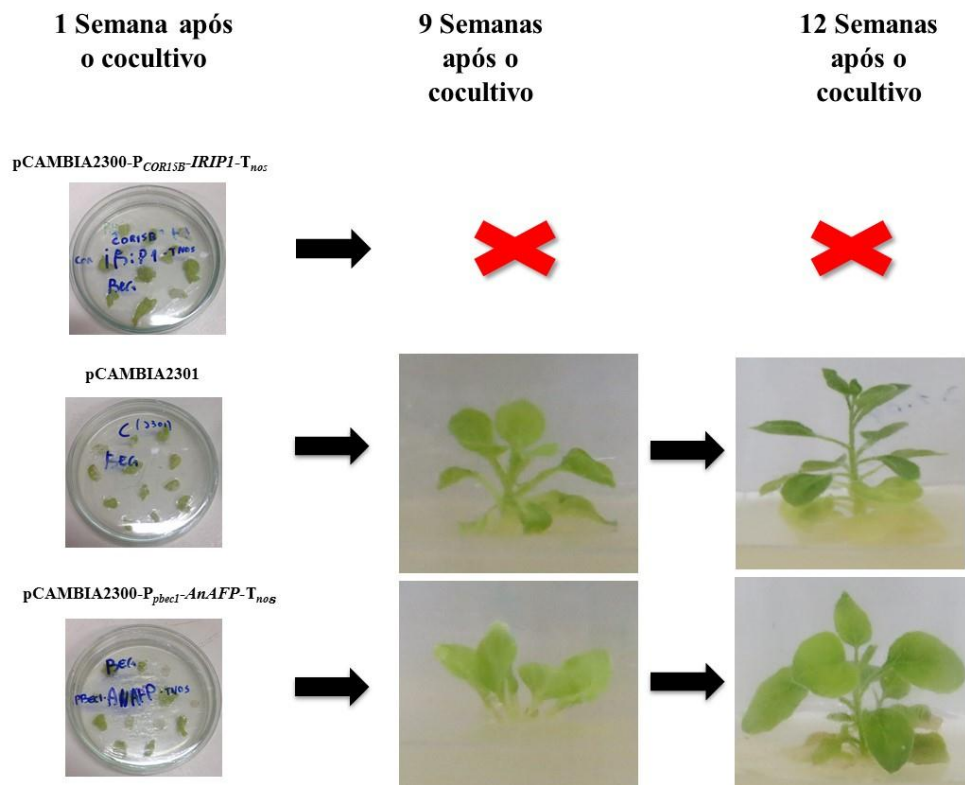
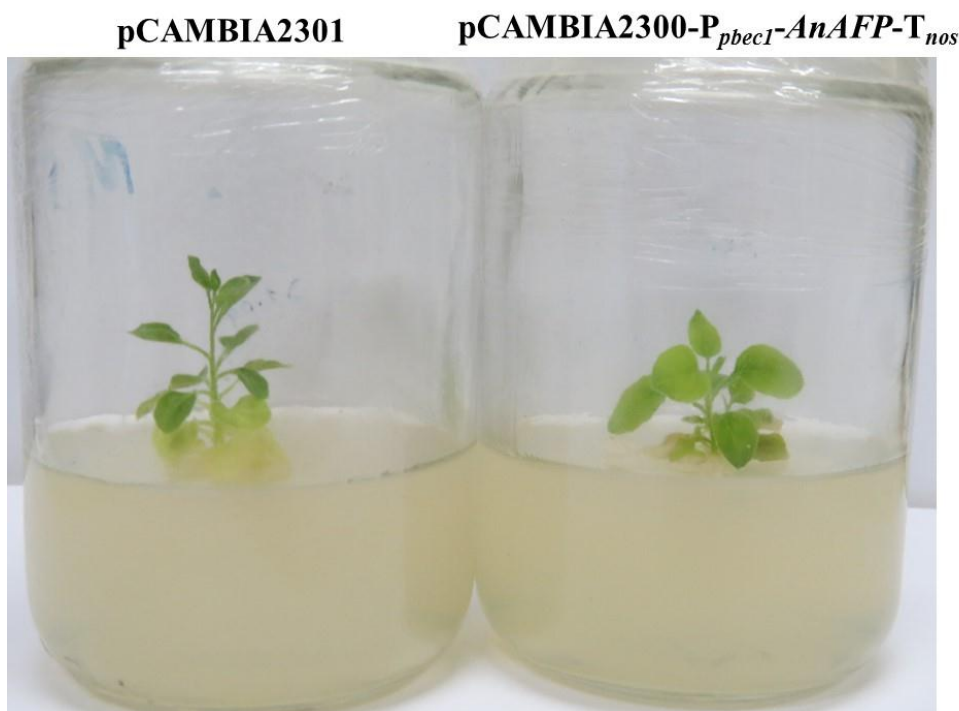


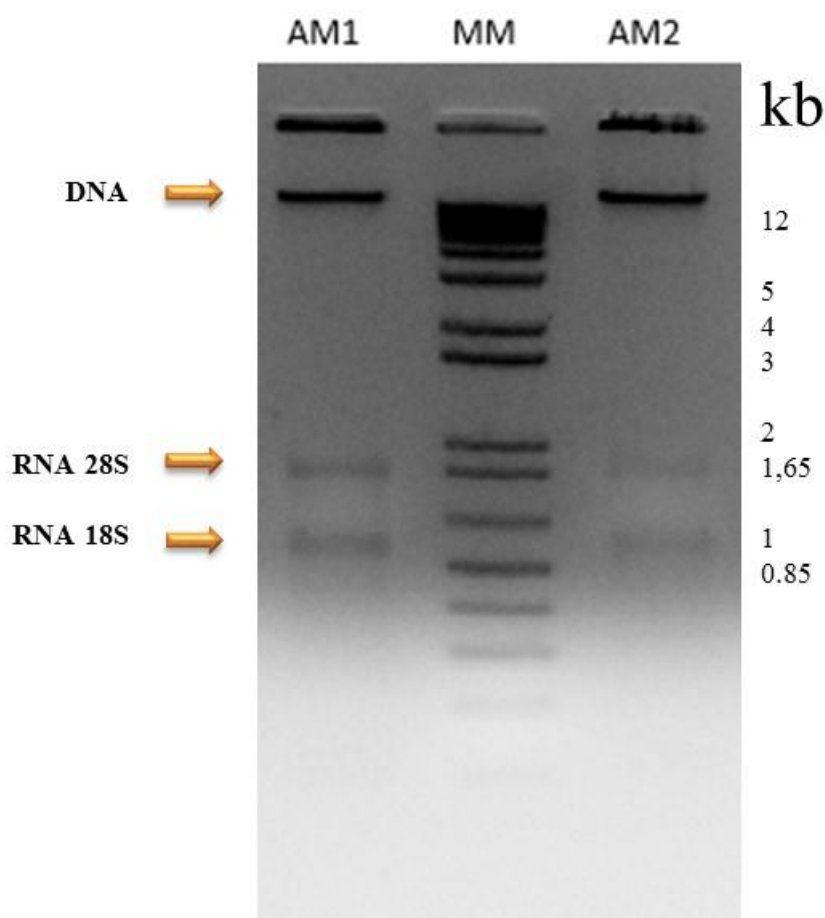
Figura 22. Esquematização do processo de seleção de brotos a partir de segmentos foliares de plantas de *N. tabacum White Mammoth* durante 1, 9 e 12 semanas após o cocultivo com suspensões de células de *A. tumefaciens EHA105* contendo pCAMBIA2300-P<sub>COR15B</sub>-IRIP1-T<sub>nos</sub>, pCAMBIA2301 e pCAMBIA2300- P<sub>pbc1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub>. Apenas 2 plantas foram regeneradas e analisadas como resultado do experimento.



**Figura 23.** Plantas de *N. tabacum White Mammoth* transformadas com *A. tumefaciens EHA105* armadas com os plasmídeos pCAMBIA2301 e pCAMBIA2300- P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub> após 12 semanas de cocultivo.

### **5.8. Análise de Plantas de *N. tabacum White Mammoth* Transformadas Geneticamente**

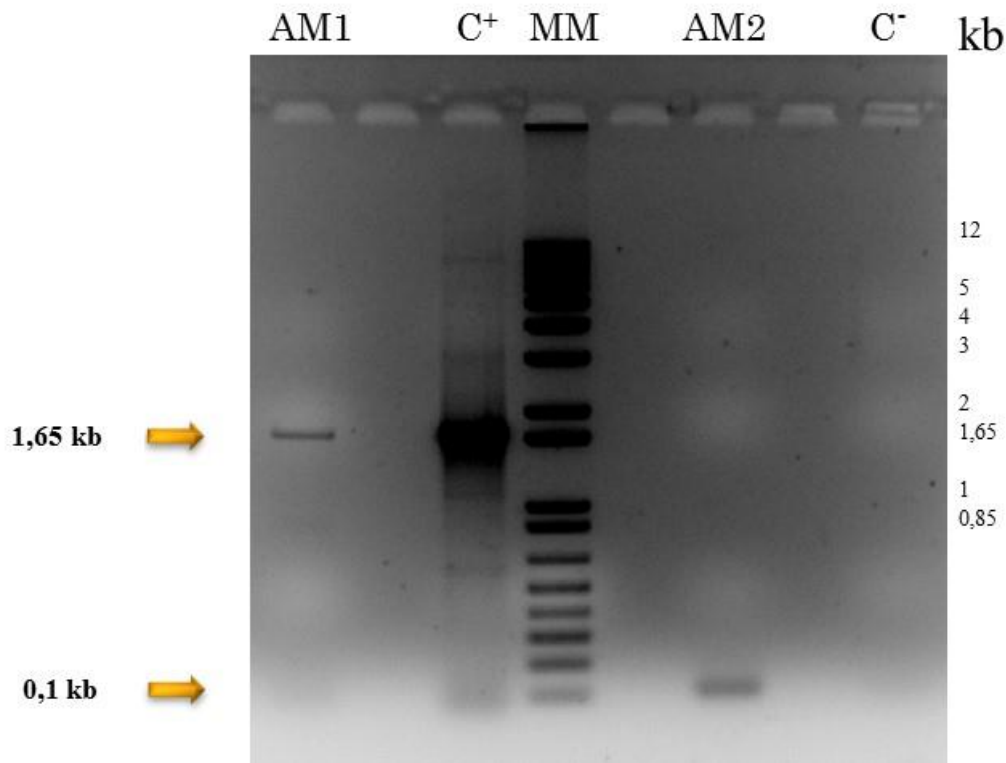
Extrações de DNA foram realizadas pelo método de DOYLE & DOYLE (1987) com o uso de folhas jovens das duas plantas regeneradas de *N. tabacum White Mammoth* transformadas com pCAMBIA2301 e pCAMBIA2300-P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub> demonstradas na Figura 23. Eletroforese em gel de agarose foi realizada para averiguar a integridade do DNA extraído. De acordo com a Figura 24, a amostra 1 (AM1) é referente ao DNA extraído de *N. tabacum* pCAMBIA2300-P<sub>pbec1</sub>-AnAFP-T<sub>nos</sub> e a amostra 2 (AM2) é referente ao DNA extraído de *N. tabacum* pCAMBIA2301. A integridade do DNA de ambas as amostras e o sucesso na etapa de extração foi, assim, confirmado.



**Figura 24. Imagem do gel de agarose submetido à eletroforese com amostras de DNA extraídas de folhas de *N. tabacum White Mammoth* geneticamente transformadas.** A presença das bandas de ácidos nucleicos demonstrou que as extrações foram realizadas com sucesso. AM1, Amostra de DNA extraída de *N. tabacum* transformadas com pCAMBIA2300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ ; AM2, Amostra de DNA extraída de *N. tabacum* transformadas com pCAMBIA2301; MM: Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

A confirmação da presença de  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  e T-DNA do vetor pCAMBIA2301 nos genomas de *N. tabacum White Mammoth* foi realizada por PCR. Nas reações, foram utilizados os *primers* *M13 (-21) Forward* e *M13 Reverse*, específicos para a região do MCS do T-DNA dos vetores pCAMBIA2300 e PCAMBIA2301. De acordo com a Figura 25, foi possível observar na amostra 1 (AM1) um fragmento amplificado com o exato tamanho do cassete gênico  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  (1,65 kb). De forma análoga, também foi possível observar, na amostra 2 (AM2), um fragmento amplificado com o tamanho esperado (0,1 kb) referente a região do MCS do vetor pCAMBIA2301 (Figura 25). Não houve qualquer

amplificação no controle negativo. Este resultado confirma que as plantas regeneradas são positivas e, portanto, transgênicas para os cassetes gênicos empregados nas transformações.



**Figura 25.** Imagem do resultado da eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$  e *GUSA* nos genomas de *N. tabacum White Mammoth* transformadas. Os primers específicos *M13* (-21) *Forward* e *M13 Reverse* permitiram à amplificação dos fragmentos esperados de 1,65 kb ( $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ ) e 0,1 kb (região do MCS) nas amostras 1 e 2, respectivamente. AM1, amostra de DNA extraída de *N. tabacum* transformada com pCAMBIA2300- $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ ; C<sup>+</sup>, controle positivo, ou seja, plasmídeo pCAMBIA2300-  $P_{pbec1}$ -*AnAFP*- $T_{nos}$ ; MM, Marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); AM2, amostra de DNA extraída de *N. tabacum* transformada com pCAMBIA2301; C<sup>-</sup>, Controle negativo, ou seja, a mistura de reação sem DNA.

## 6. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As geadas e baixas temperaturas estão entre os principais fatores limitantes para o plantio comercial de espécies de *Eucalyptus* comerciais no mundo inteiro. Deste modo, devido à ausência da tolerância nestas condições e levando-se em conta todos os danos que estes estresses causam em plantas do gênero *Eucalyptus*, há uma enorme necessidade do desenvolvimento de linhagens de *Eucalyptus* com potenciais genes que possam conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento. O efeito de *AnAFP* e *IRIP1*, descritas por DENG *et al.* (2014) e CHEW *et al.* (2012), ressaltam o potencial destes genes em conferir a tolerância pretendida em plantas. Sendo assim, a expressão dos genes *AnAFP* e *IRIP1* em *Eucalyptus* é uma abordagem promissora e que pode vir a superar os danos causados por geadas e baixas temperaturas em plantas deste gênero.

Plantas-modelo de *N. tabacum* serão novamente transformadas e avaliadas quanto à efetividade das proteínas *AnAFP* e *IRIP1* em conferir tolerância ao frio e/ou ao congelamento. As etapas de seleção de plantas transgênicas de *A. thaliana* a partir das sementes T<sub>1</sub> obtidas também serão realizadas. Dentre os objetivos propostos, pretende-se cumprir ainda aqueles que não foram realizados e que estão citados no item 3.1, ou seja:

1. Transformar plantas de *E. globulus* x *E. urophylla* com *A. tumefaciens* contendo T-DNAs dos plasmídeos binários construídos.
2. Realizar análises moleculares para avaliar o estado transgênico das plantas de *N. tabacum*, *A. thaliana* e *E. globulus* x *E. urophylla* via PCR.
3. Realizar análises moleculares para avaliar o número de cópias integradas nos genomas das plantas via AFLP.
4. Analisar a expressão dos cassetes gênicos por RT-qPCR nas plantas transgênicas.
5. Detectar os peptídeos recombinantes referentes às sequências codificadoras de proteínas “anticongelantes” por *Western blot* em plantas transgênicas.
6. Realizar ensaios de tolerância ao frio com as plantas transgênicas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABE, H; KAZUKO, A; SHINOZAKI, Y; URAO, T; LWASAKI, T; HOSOKAWA, C.D.B; SHINOZAKI, K. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression. **American Society of Plant Physiologists**, v. 9, p. 1859-1868, 1997.
- AGARWAL, M; HAO, Y; KAPOOR, A; DONG, C. H; FUJII, H; ZHENG, X; ZHU, J. K. R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 37636-37645, 2006.
- ALZATE, S. B. A. Caracterização da madeira de clones de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna* e *E. grandis* x *E. urophylla*. 2004. 151 f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.
- ANTIKAINEN, M; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. **Physiologia Plantarum**, v. 99, p. 423-432, 1997.
- ATICI, K; NALBANTOGLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1187-1196, 2003.
- BIMBOIM, H; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 1513-1526, 1979.
- BRASILEIRO, A. C. M; CARNEIRO, V. T. D. C. Manual de transformação genética de plantas. 1º edição. Brasília. **EMBRAPA-SPI**, 1998, 309 p.
- CAPICCIOTTI, C. J; DOSHI, M; BEN, R. N. Ice recrystallization inhibitors: From biological antifreezes to small molecules. In: WILSON, P (Ed). *Recent Developments in the study of recrystallization*. Ottawa: **Intech**, 2013. p. 177-224.
- CAPO, P. A indústria de celulose e papel no Brasil: A silvicultura no Brasil. [Editorial] **Guia ABTCP de Fornecedores & Fabricantes de Celulose e Papel**, v.17, p. 22-23. out, 2015.
- CHEN, L; ZHONG, H; REN, F; GUO, Q. Q; HU, X. P; LI, X. B. A novel cold-regulated gene, COR25, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 463-471, 2011.
- CHEW, O; LELEAN, S; JOHN, U. P; SPANGENBERG, G. C. Cold acclimation induces rapid and dynamic changes in freeze tolerance mechanisms in the cryophile *Deschampsia antarctica* E. Desv. **Plant, cell and environment**, v. 35, p. 229-237, 2012.



- CHINNUSAMY, V; OHTA, M; KANRAR, S; LEE, B. H; HONG, X; AGARWAL, M; ZHU, J. K. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, v. 17, p. 1043-1054, 2003.
- CHUN, J. U; YU, X. M; GRIFFITH, M. Genetic studies of antifreeze proteins and their correlation with winter survival in wheat. **Euphytica**, v. 102, p. 219-226, 1998.
- DENG, L. Q; YU, H. Q; LIU, Y. P; JIAO, P. P; ZHOU, S. F; ZHANG, S. Z, LI, W. C, FU, F.L. Heterologous expression of antifreeze protein gene AnAFP from *Ammopiptanthus nanus* enhances cold tolerance in *Escherichia coli* and tobacco. **Gene**, v. 539, p. 132-140, 2014.
- DOYLE, J. J; DOYLE, J. L; HORTORIUM, L. H. B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- DUMAN, J. G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from plant, bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1206, p. 129-135, 1994.
- EWART, K. V; LIN, Q; HEW, C. L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 271-283, 1999.
- FEI, Y. B; WEI, L. B; GAO, S. Q. Separation, purification and characterization of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus*. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, p. 2185-2189, 2000.
- FLORIANI, M.M.P. Relação da tolerância ao frio de *Eucalyptus* spp. com a concentração foliar de carboidratos solúveis totais e prolina. 2008. 55 f. **Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias - Universidade de Santa Catarina**, Lages, 2004.
- GIL, J. B; SALINAS, J. Post-translational regulation of cold acclimation response. **Plant science**, v. 205, p. 48-54, 2013.
- GRAETHER, S. P; KUIPER, M. J; GAGNE, S. M; WALKER, V. K; JIA, Z; SYKES, B. D; DAVIES, P. L. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. **Nature**, v. 406, p. 325-328, 2000.
- GUPTA, R; DESWAL, R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. **Journal of Biosciences**, v. 39, p. 931-944, 2014.

GUTHA, L. R; REDDY, A. R. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 533-555, 2008.

GWAK, I. G; JUNG, W. S; KIN, H. J; KANG, S. H; JIN, E. Antifreeze Protein in Antarctic Marine Diatom, *Chaetoceros neogracile*. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 630-639, 2010.

HIGA, A R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M. V. R. Comportamento de 20 espécies de *Eucalyptus* em área de ocorrência de geadas na região sul do Brasil. **In: Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus.,1997**, salvador. *Anais...* Colombo: Embrapa, 1997. v. 1, p. 106-110.

HON, W. C; GRIFFITH, M; CHONG, P; YANG, D. S. C. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereal L.*) leaves. **Plant Physiology**, v. 104, p. 971-980, 1994.

HON, W. C; GRIFFITH, M; MLYNARZ, A; KWOK, Y.C; YANG, D. S. C. Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 879-889, 1995.

JIA G. X; ZHU, Z. Q; CHANG, F. Q; LI, Y. X. Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 141-146, 2002.

KANDASWAMY, K. K; CHOU, K. C; MARTINETZ, T; MOLLER, S; SUGANTHAN, P. N, SRIDHARAN, S; PUGALENTHI, G. AFP-Pred: A random forest approach for predicting antifreeze proteins from sequence-derived properties. **Journal of Theoretical Biology**, v. 270, p. 56-62, 2011.

KOVALCHUK, N; JIA, W; EINI, O; MORRAN, S; PYVOVARENKO, T; FLETCHER, S; BAZANOVA, N; HARRIS, J; OLDACH, K. B, SHAVRUKOV, Y; LANGRIDGE, P; LOPATO, S. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold inducible promoters. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, p. 659-670, 2013.

KUMAR, M; CHIMOTE, V; SINGH, R; MISHRA, G. P; NAIK, P. S; PANDEY, S. K; CHAKRABARTI, S. K. Development of Bt potatoes for effective control of potato tuber moth by using *cryIAb* gene regulated by GBSS promoter. **Crop Protection**, v. 29, p. 121-127, 2010.

KWAK, K. J; KIM, Y. O; KANG, H. Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 3007-3016, 2005.

- LI, M; WANG, X; CAO, Y; LIU, X; LIN, Y; OU, Y; ZHANG, H; LIU, J. Strength comparison between cold-inducible promoters of *Arabidopsis* cor15a and cor15b genes in potato and tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 71, p. 77-86, 2013.
- LIU, J. J; EKRAMODDOULLAH, A. K. M; HAWKINS, B; SHAH, S. Overexpression of a western white pine PR10 protein enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 114, p. 217-223, 2013.
- MAGATON, A. S; de OLIVEIRA, R; LOPES, O. R; MILAGRES, F. R. Composição química da madeira de espécies de Eucalipto. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 29., 2006, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ, 2006.
- MARENTEZ, E; GRIFFITH, M; MLYNARZ, A; BRUSH, R. E. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. **Physiological Plant Pathology**, v. 87, p. 499-507, 1993.
- MEGHA, S; BASU, U; KAVI, N. N. V. Metabolic engineering of cold tolerance in plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 88-95, 2014.
- MOFFAT, B; EWART, V; EASTMAN, A. Cold comfort: plant antifreeze proteins. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 5-16, 2006.
- MUTHUKUMARAN, J; MANIVEL, P; KANNAN, M; JEYAKANTHAN, J; KRISHNA, R. A framework for classification of antifreeze proteins in over wintering plants based on their sequence and structural features. **Bioinformatics**, v. 3, p. 70-88, 2011.
- PUDNEY, P.D. A; BUCKLEY, S. L; SIDEBOTTOM, C. M; TWIGG, S. N; SEVILLA, M. P; HOLT, C. B; ROPER, D; TELFORD, J. H; MCARTHUR, A. J; LILLFORD, P. J. The physico-chemical characterization of boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 238-245, 2003.
- QI, Y. B; YE, S. H; LU, Y. T; JIN, Q. S; ZHNG, X. M. Development of marker-free transgenic *CryIAb* rice with Lepidopteran pest resistance by *Agrobacterium* mixture-mediated co-transformation. **Rice Science**, v. 16, p. 181-186, 2009.
- QIU, L; WANG, Y; WANG, J; ZANG, F; MA, J. Expression of biologically active recombinant antifreeze protein His-MpAFP149 from the desert beetle (*Microdera punctipennis dzungarica*) in *Escherichia coli*. **Molecular Biology Reports**, v. 37, p. 1725-1732, 2009.
- ROUDSARI, H. M; GOFF, H. D. Ice structuring proteins from plants: mechanism of action and food application. **Food Research International**, v. 46, p. 425-436, 2012.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETII JR, A.; Doenças do eucalipto no sul do Brasil: Identificação e Controle: **Circular Técnica 45**, Embrapa., 2001.

STEPHEN, D; JONES, D; SCHOFIELD, J. P. A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7463-7464, 1990.

THALHAMMER, A; HUNDERTMARK, M; POPOVA, A. V; SECKLER, R; HINCHA, D. K. Interaction of two intrinsically disordered plant stress proteins (COR15A and COR15B) with lipid membranes in the dry state. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1798, p. 1812-1820, 2010.

TITTARELLI, A; SANTIAGO, M; MORALES, A; MEISEL, L. A; SILVA, H. Isolation and functional characterization of cold-regulated promoters, by digitally identifying peach fruit cold-induced genes from a large EST dataset. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 121-136, 2009.

ULRIK P. JOHN, U. P; POLOTNIANKA, R. M; SIVAKUMARAN, K. A; CHEW, O; MACKIN, L; KUIPER, M. K; TALBOT, J. P; NUGENT, G. D; MAUTORD, J; SCHRAUF, G. E; SPANGENBERG, G. C. Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 336-348, 2009.

USTUN, N. S; TURHAN, S. Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. **Journal of food processing and preservation**, 2015.

VENDRUSCOLO, E. C; SCHUSTER, I; PILEGGI, M; SCAPIM, C. A; MOLINARI, H. B; MARUR, C. J; VIEIRA, L. G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1367-1376, 2007.

WORRALL, D; ELIAS, L; ASHFORD, D; SMALLWOOD, M; SIDEBOTTOM, C; LILFORD, P; TELFORD, J; HOLT, C; BOWLES, D. A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization. **Science**, v. 282, p. 115-117, 1998.

XU, Z. S; NI, Z. Y; LIU, L; NIE, L. N; LI, L. C; CHEN, M; MA, Y. Z. Characterization of the *TaAIDFa* gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 280, p. 497-508, 2008.

YAO, J. L; JI, M; CHUN, F. Z. Recent advances in research of antifreeze proteins. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 21, p. 717-722, 2005.

YIN, F; QIN, C; GAO, J; LIU, M; LUO, X; ZHANG, W; LIU, H; LIAO, X; SHEN, Y; MAO, L; ZHANG, Z; LIN, H; LÜBBERSTEDT, T; PAN, G. Genome-wide Identification and

analysis of drought-responsive genes and microRNAs in tobacco. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 5714-5740, 2015.

YOSHIDA, T; FUJITA, Y, MARUYAMA, K, MOGAMI, J, TODAKA, D; SHINOZAKI, K; SHINOZAKI, K. Y. Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, p. 35-39, 2015.

YU, S; YIN, L; MU, S. Discovery of an antifreeze protein in the leaves of *Ammopiptanthus nanus*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 90, p. 35-40, 2010.

ZHANG, X; HENRIQUES, R; LIN, S. S; NIU, Q. W; CHUA, N. H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nature protocols**, v.1, p. 641-646, 2006.