

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE GENES SINTÉTICOS EM CONFERIR
TOLERÂNCIA ÀS GEADAS EM PLANTAS**

Dissertação de Mestrado

Daniel Barletta Sulis

Porto Alegre, Abril de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE GENES SINTÉTICOS EM CONFERIR
TOLERÂNCIA ÀS GEADAS EM PLANTAS**

Daniel Barletta Sulis

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Banca examinadora: Prof. Dr. Felipe dos Santos Maraschin

Prof. Dra. Janette Palma Fett

Dr. Luís Fernando Revers

Porto Alegre, Abril de 2018

Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a execução do mesmo, contou-se com bolsa de mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer os meus pais, Anete Barletta Sulis e Gilberto Renato Sulis, por terem me proporcionado a oportunidade de estudar, fornecendo todo o suporte para o desenvolvimento da minha formação acadêmica.

À minha avó Hilga Sulis, meu grande exemplo de vida devido à sua alegria e vontade de viver, e aos meus falecidos avós Paulo Sulis, Felício Barletta e Carmen Barletta.

À minha namorada Bárbara Machado Marques. O teu apoio, compreensão, paciência e conversas sobre ciência, experimentos e resultados obtidos foram fundamentais durante esta caminhada. Obrigado por todos momentos especiais que passamos juntos!

Aos meus amigos, principalmente a aqueles que eu tive o prazer de conviver quase que diariamente neste período. Carolina Girardi, Isadora Bianchin, Raíssa Volpato, Thaís Lopes e Thomaz Trenz, levarei a amizade de vocês sempre comigo! Além disto, gostaria de fazer um agradecimento em particular à Isadora que, durante o período em que estive no laboratório como iniciação científica, demonstrou muita pró-atividade e me ajudou bastante nos experimentos realizados.

Aos membros da minha Comissão de Acompanhamento, Professores Arthur Fett Neto e Felipe dos Santos Maraschin, pela disponibilidade, sugestões relacionadas ao desenvolvimento do trabalho, e até mesmo o envolvimento direto na execução deste.

Ao meu Orientador Giancarlo Pasquali pelos ensinamentos, orientação e interesse ao longo do período em que eu estive trabalhando em seu laboratório, além de me proporcionar a oportunidade de conhecer e trabalhar na área de biotecnologia vegetal.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. <i>Eucalyptus</i>	17
1.2. <i>Eucalyptus</i> no Brasil.....	18
1.3. Geadas e Baixas Temperaturas	20
1.4. Proteínas e Glicoproteínas Anticongelantes	21
1.4.1. Histerese térmica (TH).....	22
1.4.2. Inibição da recristalização de cristais de gelo (IRI).....	24
1.4.3. Diversidade estrutural e funcional de AFPs/AFPGs.....	25
1.4.4. AFP/AFPGs em plantas	26
1.5. Engenharia Genética e Biotecnologia Vegetal.....	30
1.5.1. Métodos Alternativos para a Obtenção de Plantas Expressando Genes de Interesse.....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Revisão Bibliográfica e Busca na Literatura Científica por Sequências Gênicas de Interesse	35
4.2. Análises <i>in Silico</i>	35
4.3. Etapas de Clonagem Molecular	36
4.3.1. Confirmação da presença dos genes P_{COR15B} - <i>DaIRIP1-T_{nos}</i> e P_{pbec1} - <i>AnAFP-T_{nos}</i> no vetor pUC57	36
4.3.2. Isolamento dos cassetes gênicos do vetor pUC57	38
4.3.3. Inserção dos genes sintéticos no plasmídeo binário pCAMBIA2300 ...	39
4.3.4. Isolamento das sequências codificadoras das proteínas DaIRIP1 e AnAFP do plasmídeo pUC57.....	41

4.3.5.	Inserção das sequências codificadoras das proteínas DaIRIP1, AnAFP e GFP no plasmídeo p28_35S_Gateway	42
4.4.	Transformação Genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	43
4.5.	Cultivo e Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
4.6.	Cultivo e Inoculação das Versões Recombinantes de p28_35S_Gateway em <i>Eucalyptus globulus</i>	45
4.7.	Extração de DNA de <i>A. thaliana</i>	46
4.8.	Confirmação da Presença dos Genes <i>P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}</i> e <i>P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}</i> e <i>GUS</i> em <i>A. thaliana</i>	46
4.9.	Análises Fenotípicas de Plantas Transgênicas de <i>A. thaliana</i>	47
4.10.	Ensaio de Tolerância ao Congelamento	47
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Definição das Sequências Gênicas e Projeção dos Genes Sintéticos.....	49
5.2.	Análises <i>in Silico</i> das Sequências Promotoras.....	52
5.3.	Confirmação da Integridade dos Genes Sintéticos em pUC57	54
5.4.	Isolamento dos Genes de Interesse do Vetor Plasmidial pUC57	55
5.5.	Isolamento das Sequências Codificadoras das Proteínas DaIRIP1 e AnAFP de pUC57	57
5.6.	Inserção das Sequências Codificadoras das Proteínas DaIRIP1, AnAFP e GFP no Plasmídeo p28_35S	57
5.7.	Transformação Genética de Células de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 com pCAMBIA2300 Contendo os Genes <i>P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}</i> e <i>P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}</i>	59
5.8.	Transformação Genética de <i>A thaliana</i> com Linhagens de <i>A. tumefaciens</i> EHA105	60
5.9.	Análises Fenotípicas de Plantas Transgênicas de <i>A. thaliana</i>	61
5.10.	Ensaio de Tolerância ao Congelamento	63
5.11.	Avaliação da Expressão de <i>gfp</i> em Plantas de <i>Eucalyptus</i> Inoculadas com p28_35S_Gateway- <i>gfp</i> e p1470	66
6.	DISCUSSÃO	68

7. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
8. REFERÊNCIAS	76
9. Currículo vitae	88
1. Dados Pessoais	88
2. Formação Acadêmica	88
3. Estágios	88
4. Prêmios e Distinções	89
6. Resumos Publicados em Anais de Congressos	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade fenotípica de espécies de <i>Eucalyptus</i>	17
Figura 2. Mapa do Brasil com áreas de árvores plantadas nos estados brasileiros	18
Figura 3. Danos causados por geadas em plantas de <i>E. grandis</i>	20
Figura 4. Crescimento e efeito na morfologia de cristais de gelo quando incubados com AFPs/AFGPs	23
Figura 5. Gráfico representativo do processo de histerese térmica	24
Figura 6. Demonstração do processo de IRI	25
Figura 7. Danos causados pela formação de cristais de gelo no meio extracelular, vias de secreção, modificações pós-traducionais e mecanismo de ação de AFPs/AFGPs para promover tolerância ao congelamento em plantas	28
Figura 8. Vetores pIR e p1470 da plataforma IL-60	32
Figura 9. Mapa dos plasmídeos binários pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301	40
Figura 10. Projeção dos genes sintéticos $P_{Ppbec1-AnAFP-Tnos}$ e $P_{COR15B-DaIRIP1-Tnos}$	52
Figura 11. Elementos <i>cis</i> -atuantes de DNA identificados nas sequências P_{COR15B} e P_{Ppbec1}	53
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose do plasmídeo pUC57 contendo os genes de interesse	55
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos genes $P_{COR15B-DaIRIP1-Tnos}$ e $P_{Ppbec1-AnAFP-Tnos}$ e das versões recombinantes e não recombinantes de pCAMBIA2300 hidrolisados com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI	56
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR referentes às sequências codificadoras de proteínas <i>DaIRIP1</i> e <i>AnAFP</i>	57
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose dos plasmídeos pENTR/D-TOPO- <i>DaIRIP1</i> , pENTR/D-TOPO- <i>AnAFP</i> , p28_35S_Gateway- <i>DaIRIP1</i> e p28_35S_Gateway- <i>AnAFP</i> hidrolisados com enzimas de restrição	58

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de plantas de <i>A. thaliana</i> ::pCAMBIA2300- P_{COR15B} - <i>DaIRIP1</i> - T_{nos} e <i>A. thaliana</i> ::pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} - <i>AnAFP</i> - T_{nos} e ensaio histoquímico da enzima β -glucoronidase (GUS) em plantas de <i>A. thaliana</i> ::pCAMBIA2300	60
Figura 17. Fenótipos de plantas de <i>A. thaliana</i> WT e contendo o gene P_{COR15B} - <i>DaIRIP1</i> - T_{nos} mantidas a 22 °C	62
Figura 18. Ensaios de tolerância ao congelamento <i>in vitro</i> com plantas de <i>A. thaliana</i> controle e contendo o gene P_{Ppbec1} - <i>AnAFP</i> - T_{nos}	64
Figura 19. Ensaios de tolerância ao congelamento em solo com plantas de <i>A. thaliana</i> controle e contendo o gene P_{Ppbec1} - <i>AnAFP</i> - T_{nos}	65
Figura 20. Microscopia de fluorescência de folhas de plantas de <i>E. globulus</i> controle e infiltradas com os plasmídeos p28_35S_Gateway-GFP e p1470. As imagens foram registradas 5 dias após o tratamento	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Países maiores produtores de celulose e papel	19
Tabela 2. Proteínas anticongelantes identificadas em espécies de plantas	27
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados neste trabalho para PCRs e sequenciamento de DNA	38
Tabela 4. Programa do termociclador para PCR com vistas a amplificar a sequência codificadora de <i>DaIRIP1</i>	41
Tabela 5. Programa do termociclador para PCR com vistas a amplificar a sequência codificadora de <i>AnAFP</i>	42
Tabela 6. Programa do termociclador para PCR para a confirmação da presença dos genes <i>P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}</i> e <i>P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}</i> no genoma de plantas de <i>A. thaliana</i>	46
Tabela 7. Sequências promotoras responsivas ao frio analisadas neste trabalho	50
Tabela 8. Sequências codificadoras de proteínas analisadas neste trabalho	51

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>
ABRE	Elemento responsivo ao ácido abscísico, do inglês, <i>abscisic acid responsive element</i>
ACR	Associação Catarinense de Empresas Florestais
AFGP	Glicoproteína anticongelante, do inglês, <i>antifreeze glycoprotein</i>
AFP	Proteína anticongelante, do inglês, <i>antifreeze protein</i>
H ⁺ -ATPase	Proteína ATPases bombeadoras de próton
<i>AmpR</i>	Gene de resistência à ampicilina
BAK1	Receptor do tipo quinase de brassinoesteróide, do inglês, <i>brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1</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>
CaMV	Vírus do mosaico da couve-flor, do inglês, <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CaMV poly(A) <i>signal</i>	Sinal de poliadenilação do CaMV
CaMV 35S	Promotor 35S do CaMV
<i>cat1 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>
CIF	Centro de Inteligência de Florestas

CIAP	Enzima fosfatase alcalina de intestino de bezerros, do inglês, <i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
COL-0	Ecotipo Columbia
CNGC17	Canal iônico regulado por nucleotídeos cíclicos, do inglês, <i>cyclic nucleotide-gated cation channel 17</i>
COR	Proteína regulada pelo frio, do inglês, <i>cold regulated protein</i>
°C	Graus Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>deoxyribobucleic acid</i>
dNTP's	Desoxirribonucleosídeos trifosfatados, do inglês, <i>Deoxyribonucleoside triphosphate</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
GTGA-Motif	Região GTGA, do inglês, <i>GTGA motif</i>
<i>gusA</i>	Gene repórter codificador da proteína β-glicuronidase
h	Hora(s)
ha	Hectare(s)
<i>HygR</i>	Gene de resistência à higromicina
IBÁ	Indústria Brasileira de Árvores
IBPs	Proteínas que se ligam a cristais de gelo, do inglês, <i>ice binding proteins</i>
INPs	Proteínas que promovem a formação de cristais de gelo, do inglês, <i>ice nucleation proteins</i>
IRI	Inibição da recristalização, do inglês, <i>ice recrystallization inhibition</i>

IRIPs	Proteínas inibidoras do processo de recristalização de cristais de gelo, do inglês, <i>ice recrystallization inhibition proteins</i>
ISAAA	Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia, do inglês, <i>International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications</i>
<i>KanR</i>	Gene de resistência à canamicina
L	Litro(s)
<i>lacZa</i>	Gene que codifica a proteína β -galactosidade
LB	Borda esquerda, do inglês, <i>left border</i>
LRR	Repetição rica em leucinas, do inglês, <i>leucine rich repeat</i>
LTRE	Elemento responsivo às baixas temperaturas, do inglês, <i>low temperature responsive element</i>
L-B	Meio de cultura Luria-Bertani
mA	Miliampere(s)
MCS	Sítio múltiplo de clonagem, do inglês, <i>multiple cloning site</i>
mg	Miligramma(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mRNA	RNA mensageiro, do inglês, <i>messenger RNA</i>
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 M13 Forward</i>

M13 rev	Sítio de anelamento para o <i>primer M13 Reverse</i>
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
NeoR	Gene de resistência à neomicina e derivados como a canamicina
ori	Origem de replicação
<i>o/n</i>	Durante a noite, do inglês, <i>overnight</i>
PCR	Reação em cadeia da enzima DNA polimerase, do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> .
PRE	Elemento responsivo à hiposmolaridade do inglês, <i>Pro- or hypoosmolarity-responsive element</i>
POLLEN1LELAT52	Sequência Polén-1 do gene <i>LAT52</i> de <i>Lycopersicon esculentum</i> , do inglês, <i>pollen 1 Lycopersicon esculentum LAT52 gene</i>
PSK	Receptor do tipo quinase do hormônio peptídico vegetal fitosulfoquina
pVS1 RepA	Origem de replicação referente ao organismo mutante <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente ao vanádio
pVS1 StaA	Região de estabilidade do genoma do organismo mutante <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente ao vanádio
RB	Borda direita, do inglês, <i>right border</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
ssDNA	Do inglês, <i>single strand DNA</i>
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa, do inglês, <i>reverse transcription-quantitative PCR</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tf	Temperatura de solidificação ou congelamento, do inglês, <i>freeze temperature</i>

TH	Histerese térmica, do inglês, <i>thermal hysteresis</i>
T _m	Temperatura de fusão, do inglês, <i>melting temperature</i>
TYLCV	Geminivírus do frisado amarelo do tomateiro, do inglês, <i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i>
T-DNA	DNA de transferência, do inglês, <i>transfer DNA</i>
TE	Tampão Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
V	Volt(s)
W-BOX	Região de ligação do fator de transcrição WRKY, do inglês, <i>WRKY-BOX</i>
6xHis	Sequência contendo 6 resíduos de histidina

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e é composto em sua maioria por arbóreas florestais. Dentre outras aplicações, as espécies de *Eucalyptus* 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. urophylla* x *E. globulus*, 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 os recorrentes e irregulares eventos de geadas continuam a causar severos danos nas árvores e perdas na produtividade de madeira. Desta maneira, o objetivo proposto é testar a capacidade de genes sintéticos em conferir tolerância ao congelamento em plantas-modelo de *Arabidopsis thaliana* para que, futuramente, os mesmos possam ser empregados na obtenção de plantas transgênicas de *Eucalyptus* tolerantes às geadas. Baseados em trabalhos recentes publicados na literatura científica, foram selecionadas sequências promotoras responsivas ao frio e sequências codificadoras de proteínas potencialmente capazes de conferir tolerância ao congelamento. As sequências promotoras e codificadoras de proteínas, em conjunto com o terminador do gene codificador da enzima nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*, foram agrupadas em dois cassetes gênicos nomeados de P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e P_{Ppbc1} -*AnAFP*- T_{nos} . As sequências nucleotídicas foram enviadas à empresa *GenScript* (EUA) onde foram sintetizadas e ligadas ao vetor plasmidial pUC57. Ambos os cassetes gênicos foram isolados do vetor pUC57 com o uso de enzimas de restrição. Posteriormente, os cassetes gênicos foram ligados ao plasmídeo pCAMBIA2300. As versões recombinantes de pCAMBIA2300 foram utilizadas para a transformação de plantas de *A. thaliana* via *A. tumefaciens*. Plantas transgênicas foram selecionadas por meio de resistência frente à canamicina e o estado de transgenia foi confirmado via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Por fim, as linhagens obtidas foram avaliadas quanto à tolerância ao congelamento. Em paralelo, um método alternativo baseado em plasmídeos derivados de vírus foi avaliado para a obtenção de plantas de *Eucalyptus* expressando o gene repórter *gfp*. Futuramente, o método empregado poderá ser utilizado para a aquisição de plantas de *Eucalyptus* contendo genes de interesse.

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

ABSTRACT

The genus *Eucalyptus* belongs to the Myrtaceae family and most of its species are forest trees. Some *Eucalyptus* species have key importance for the industries of cellulose and paper besides other applications. The low temperatures in South Brazil during winter limit considerably the growth and exploitation of the genus in Southern states. The development of hybrid lineages like *E. urophylla* x *E. globulus*, combining a temperate and a tropical species, has proven great success in the forestry of subtropical regions. Nevertheless, erratic and repetitive frost events critically damage trees and determine great losses in timber production. In an attempt to improve frost tolerance in *Eucalyptus*, we are testing the capacity of synthetic genes to confer cold or freezing tolerance in plants. *Arabidopsis thaliana* is being employed as model plant to evaluate the potential of 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, besides cold responsive promoters and terminator regions. Gene sequences were combined with the terminator region of the nopaline synthase gene from *Agrobacterium tumefaciens* in two different synthetic genes called P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} and P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} . Nucleotide sequences were synthesized and cloned into pUC57 by *GenScript* (USA). Both genes were digested from pUC57 by restriction enzymes and cloned into pCAMBIA2300 binary vector. *A. thaliana* plants were genetically transformed with the synthetic genes by *A. tumefaciens*. Transgenic lines were selected by antibiotic resistance and then confirmed by PCR. Later, freezing assays were carried out to check the ability of either gene to confer plant freezing tolerance. In parallel, an alternative method based on designed plasmids from viral genome sequences was performed to obtain *Eucalyptus* plants expressing the *gfp* gene. This method may be applied to obtain *Eucalyptus* plants with the interest traits.

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

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e é composto em sua maioria por arbóreas florestais (TSUCHIHARA *et al.*, 2010; **Figura 1**). Atualmente, mais de 700 espécies e em torno de 2.000 híbridos de *Eucalyptus* já foram registrados, sendo que a maior parte destes é oriundo da região da Austrália e/ou de ilhas localizadas nas suas proximidades. As interessantes propriedades silviculturais do eucalipto como, por exemplo, o alto teor de celulose (43,8 - 54,4%) e o relativo baixo teor de lignina (24,5 - 28,6%), associados com a vasta adaptabilidade e crescimento rápido em diversas condições edafoclimáticas, despertaram interesse para o plantio de *Eucalyptus* no mundo inteiro. As espécies do gênero *Eucalyptus* são as arbóreas mais dispersadas no mundo, possuindo cerca de 20 milhões de hectares (ha), sendo a África do Sul, a Austrália, o Brasil, o Chile, a China, a Espanha, a Índia, Portugal, Uruguai e Vietnã os países detentores das maiores áreas de cultivo (MAGATON *et al.*, 2006; GIT Forest Consulting, 2008 – dados disponíveis em http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm; MYBURG *et al.*, 2014).

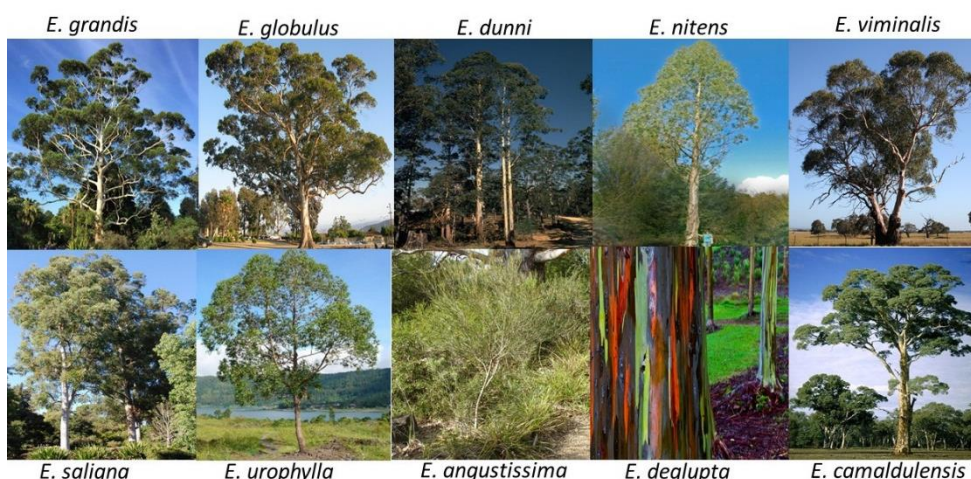


Figura 1: Diversidade fenotípica de espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*.

1.2. *Eucalyptus* no Brasil

O Brasil possui posição de destaque no plantio de *Eucalyptus*. Segundo dados publicados pela Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ) relativos ao ano de 2016, o território brasileiro possui 7,84 milhões de ha de florestas plantadas, sendo que 5,7 milhões são referentes a *Eucalyptus*. Conforme pode ser visualizado na **Figura 2**, os estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%), Mato Grosso do Sul (15%), Bahia (11%), Rio Grande do Sul (6%), Paraná (5%) e Santa Catarina (3,4%) detêm as maiores áreas de cultivo (IBÁ, 2017 - http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf). Dentre as espécies cultivadas, de acordo com o Centro de Inteligência de Florestas (CIF), 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 híbridos destes (dados disponíveis em <http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>).

ÁREAS DE ÁRVORES PLANTADAS NO BRASIL POR ESTADO E POR GÊNERO, 2016
AREA OF TREES PLANTED IN BRAZIL BY STATE AND SPECIES (2016)

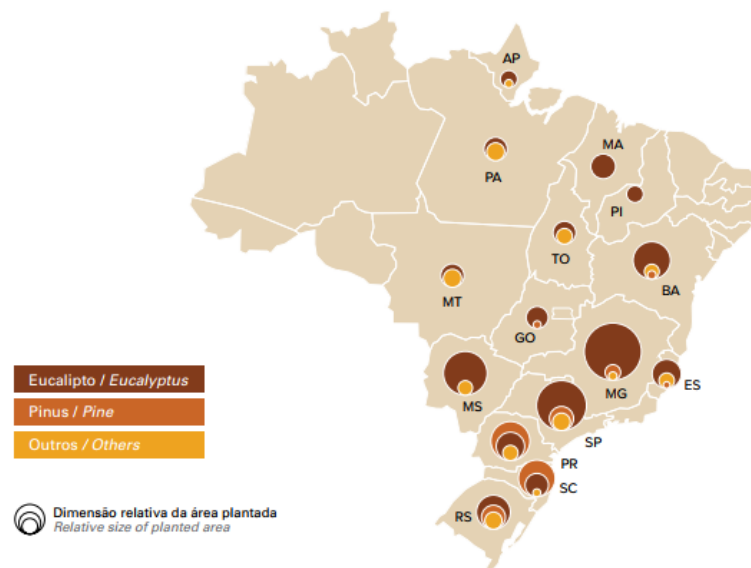


Figura 2: Áreas de árvores plantadas nos estados brasileiros: As cores relativas às árvores de *Eucalyptus*, *Pinus* e outras estão representadas na legenda da imagem. Os tamanhos dos círculos apresentados são relativos às proporções das áreas de plantio em relação à totalidade de *Eucalyptus* no Brasil [Imagem extraída de IBÁ (2017)].

Dentre as diversas aplicações da madeira de *Eucalyptus*, a principal está na produção de celulose e papel, sendo que as indústrias destes produtos concentram as maiores áreas de floresta plantada no Brasil (34%). Entretanto, outros segmentos também apresentam destaque como, por exemplo, os produtores independentes e fomentados (26,8%) e a indústria siderúrgica que utiliza carvão vegetal (15,2%). O restante pertence aos investidores financeiros (10,2%), indústria de painéis reconstituídos (6,8%) e, em menor escala, nos segmentos de madeira serrada, móveis e outros produtos sólidos (3,6%) e outros usos (3,4%), conforme estatísticas de 2014 (IBÁ, 2015 - dados disponíveis em http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf). Tais indicadores evidenciam que o maior detentor e consumidor de florestas plantadas no Brasil é o segmento de celulose e papel, o qual se encontra em expansão sustentada por novos investimentos e projetos industriais (Associação Catarinense de Empresas Florestais, 2016 - dados disponíveis em http://www.acr.org.br/download/biblioteca/ACR_2016.pdf). Neste cenário de expansão, o Brasil encontra-se em evidência, sendo o quarto e nono maior produtor de celulose e papel, respectivamente (**Tabela 1**).

Tabela 1: Países maiores produtores de celulose e papel (ACR 2016)

CELULOSE		PAPEL	
PAÍS	PERCENTAGEM (%)	PAÍS	PERCENTAGEM (%)
1. EUA	26 %	1. China	26 %
2. China	10 %	2. EUA	18 %
3. Canadá	9 %	3. Japão	7 %
3. Brasil	9 %	4. Alemanha	6 %
5. Suécia	6 %	9. Brasil	2,6 %

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. Igualmente, a estagnação da produtividade dos plantios nacionais, como resultado da redução de investimentos governamentais no setor, a diminuição nas taxas de crescimento de produção de papel e celulose, o aumento de consumo de madeira e, por fim, as ameaças trazidas pelas mudanças climáticas, criaram a necessidade de buscar novas espécies, variedades, linhagens e híbridos de *Eucalyptus* (CAPO, 2015). Além disto, a expansão das áreas de cultivo e plantio

também se faz necessária, incluindo as regiões denominadas não-ótimas para o crescimento das espécies comercialmente disponíveis como, por exemplo, regiões com baixas temperaturas e geadas.

1.3. Geadas e Baixas Temperaturas

Apesar da grande adaptabilidade às diferentes regiões (tropical e subtropical), baixas temperaturas ocorrentes no inverno limitam consideravelmente o crescimento e a exploração de espécies do gênero *Eucalyptus* em regiões temperadas. O desenvolvimento de linhagens híbridas como *E. urophylla* x *E. globulus*, combinando espécies de climas tropical e temperado, tem demonstrado ser bastante efetivo na silvicultura em regiões subtropicais. Entretanto, os eventos irregulares e repetitivos de geadas acarretam severos danos às plantas e prejuízos na produção de madeira. Tipicamente, geadas ocasionam danos nas copas das árvores (**Figura 3**), promovendo taxas de reduções de até 50% de biomassa de plantas de *Eucalyptus* no ano seguinte e, inclusive, a morte das mesmas (FILHO & DOS SANTOS, 2005; ELOY *et al.*, 2013). Segundo dados publicados por HIGA *et al.* (1995), eventos de geadas registrados no ano de 1972 promoveram perdas de até 100% em talhões de espécies de *Eucalyptus*.



Figura 3: Danos promovidos por geadas em plantas de *E. grandis*. A: plantas de *E. grandis* antes da ocorrência de geadas; B: plantas de *E. grandis* apresentando queimaduras na parte vegetativa após a ocorrência de geadas. (Fonte: ELOY *et al.*, 2013).

Além disto, geadas comumente ocasionam danos no meristema apical das plantas, originando o crescimento ramificado das partes aéreas e inviabilizando a utilização comercial do *Eucalyptus* (KOZLOWSKI *et al.*, 1992; FREITAS & BERTI FILHO, 1994; HIGA *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2001). HIGA *et al.* (1997), avaliando o comportamento de espécies de *Eucalyptus* em Campo do Tenente - Paraná, revelaram que as espécies de clima temperado *E. dunnii* Maiden e *E. camaldulensis* Dehnh apresentaram taxas de sobrevivência acima de 70%, porém 27% das árvores remanescentes apresentaram bifurcações após eventos de geadas, demonstrando a sensibilidade do meristema apical das espécies do gênero às baixas temperaturas (CARON *et al.*, 2011).

Geadas e temperaturas abaixo de 0 °C promovem a formação de cristais de gelo no meio extracelular dos tecidos vegetais. Os cristais de gelo podem ocasionar a ruptura das membranas celulares e a 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 no qual as células se encontram (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). Plantas de clima temperado desenvolveram uma série de mecanismos em níveis fisiológicos, moleculares e bioquímicos para tolerar as baixas temperaturas. Dentre estes mecanismos, destacam-se: a troca na composição de lipídeos de membrana; o acúmulo de osmólitos de baixo peso molecular, tais como açúcares e aminoácidos; o remodelamento da cromatina; a ativação de canais iônicos; as alterações nos padrões de modificações pós-transcricionais e pós-traducionais; a síntese de proteínas em respostas ao frio como, por exemplo, os fatores de transcrição, as enzimas antioxidantes, as desidrinas, as chaperonas moleculares e as proteínas e glicoproteínas anticongelantes (AFPs/AFGPs, do inglês, *antifreezing proteins/antifreezing glycoproteins*; KNIGHT & KNIGHT, 2012; MEGHA *et al.*, 2014).

1.4. Proteínas e Glicoproteínas Anticongelantes

As AFPs e AFGPs são proteínas que possuem a propriedade de se ligar aos cristais de gelo e, portanto, podem ser classificadas como proteínas da classe IBP (do inglês, *ice-binding proteins*; BREDOW *et al.*, 2017b). Desde sua descoberta, em peixes teleósteos na região Ártica por SCHOLANDER *et al.* (1957), diversos tipos de AFPs/AFGPs já foram identificadas em espécies de bactérias, fungos, insetos e plantas, sendo a distribuição destas proteínas limitada às espécies expostas aos ambientes com baixas temperaturas (EWART *et al.*, 1999). 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 adsorção das proteínas nestas superfícies torna as adições de novas moléculas de água aos cristais de gelo em formação energeticamente desfavoráveis sob temperaturas próximas a 0 °C. Em consequência disso, as interações entre AFPs/AFGPs e cristais de gelo apresentam dois efeitos práticos: a histerese térmica (TH, do inglês, *thermal hysteresis*) e a inibição da recristalização (IRI, do inglês, *ice recrystallization inhibition*). Devido a esta atividade, estas proteínas também podem ser chamadas de IRIPs (do inglês, *ice recrystallization inhibition proteins*). 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 de baixas temperaturas (JOHN *et al.*, 2009).

1.4.1. Histerese térmica (TH)

Os cristais de gelo contêm dois planos distintos em suas estruturas, denominados 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 (**Figura 4B**; GUPTA & DESWAL, 2014).

Contudo, na presença dos agentes anticongelantes, algumas alterações na dinâmica de crescimento dos cristais podem ser visualizadas. As AFPs/AFGPs ligam-se a regiões específicas nas superfícies cristalinas. Preferencialmente, a adsorção 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 são interrompidos (**Figura 4**). 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 da redução do ponto de congelamento da água pela presença de solutos. Apesar disto, como pode ser visualizado na **Figura 4B**, os cristais de gelo podem continuar crescendo e se expandindo caso a temperatura da 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).

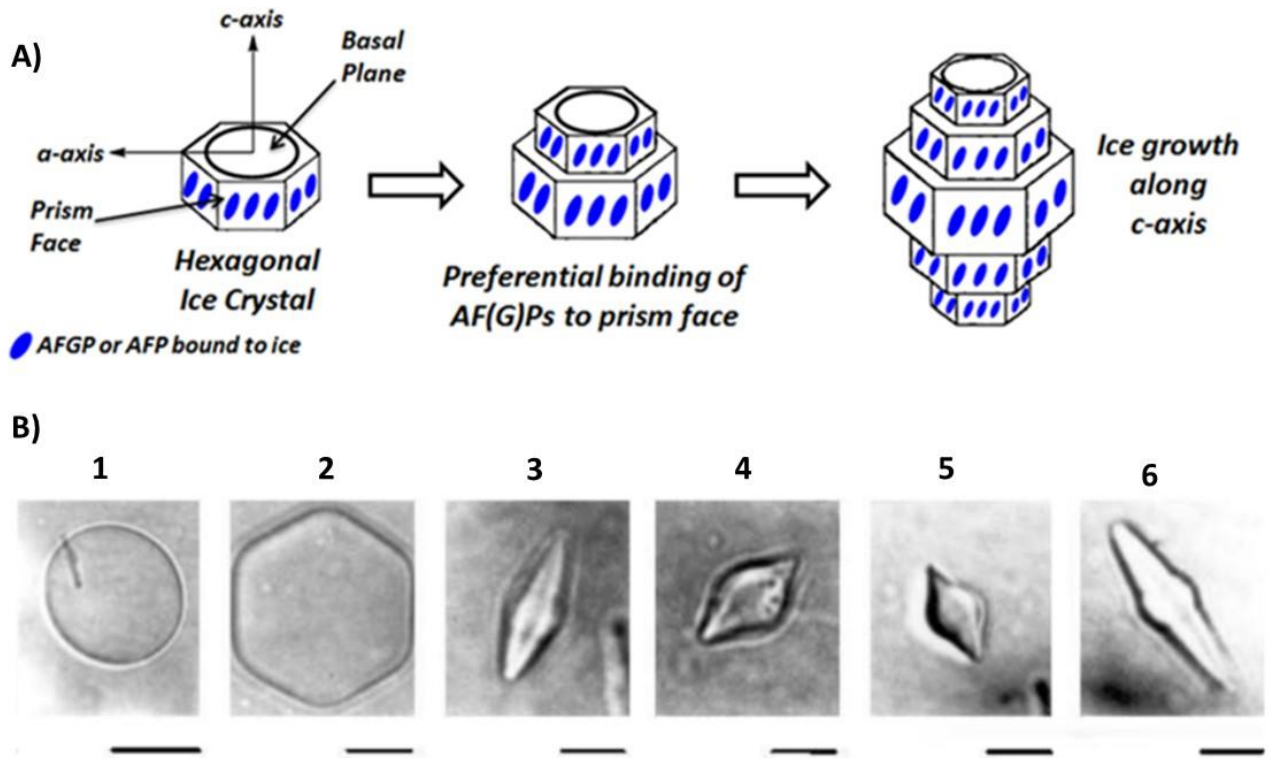


Figura 4. Crescimento e efeito na morfologia de cristais de gelo quando incubados com AFPs/AFGPs. **(A):** As AFPs/AFGPs impedem o crescimento e a expansão dos cristais de gelo ao longo do eixo A. **(B):** O cristal de gelo não incubado com AFPs/AFGPs apresenta uma estrutura circular e achatada (1); o cristal de gelo incubado com AFPs/AFGPs (2-6) apresenta transições morfológicas na estrutura de circular e achatado para hexágono-bipiramidal. Barras de ampliação = $10 \mu\text{m}^{-1}$. (Fonte: adaptado de MOFFATT *et al.*, 2006; adaptado de CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

Entretanto, nessas 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 5**; ATICI *et al.*, 2003; MOFFATT *et al.*, 2006; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

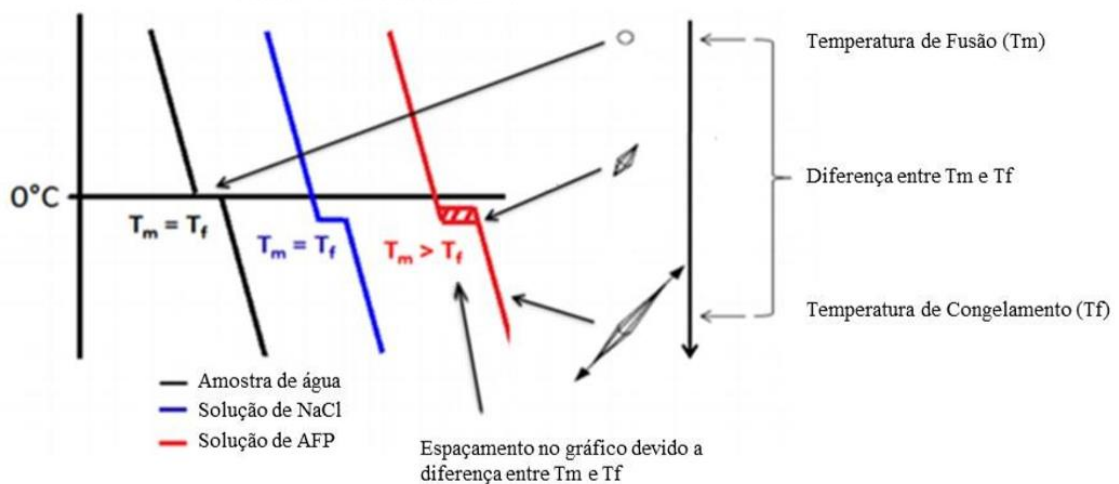


Figura 5. Gráfico representativo do processo de histerese térmica. Em amostras contendo somente água, o ponto de fusão (T_m , do inglês, *melting temperature*) e solidificação ou congelamento (T_f , do inglês, *freezing temperature*) é o mesmo, ou seja, $0\text{ }^\circ\text{C}$ (linha preta). Em soluções contendo água e cloreto de sódio (NaCl), ocorre uma diminuição nas T_m e T_f . Entretanto, ambas as temperaturas alteradas permanecem equidistantes (linha azul). Em soluções contendo AFPs/AFGPs, ocorre uma diminuição na T_f . Entretanto, a T_m permanece inalterada (linha vermelha). Sendo assim, como demonstrado na Figura, ocorre um espaçamento no gráfico entre os pontos devido a diferenças 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 $0\text{ }^\circ\text{C}$ na amostra contendo apenas água, a morfologia apresentada é circular e achatada; em temperaturas iguais à 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).

1.4.2. Inibição da recristalização de cristais de gelo (IRI)

As AFPs/AFGPs apresentam um segundo tipo de atividade, além de impedir o crescimento e a expansão de cristais de gelo individualizados. As ligações de AFPs/AFGPs impedem a associação entre pequenos cristais de gelo, evitando a formação de grandes cristais nos ambientes celulares e extracelulares e os danos que estes causam na estrutura das células (CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). Este fenômeno é conhecido como IRI (**Figura 6**) 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; JINYAO *et al.*, 2005; HASSAS-ROUDSARI *et al.*, 2012; GUPTA & DESWAL, 2014; USTUN *et al.*, 2015)

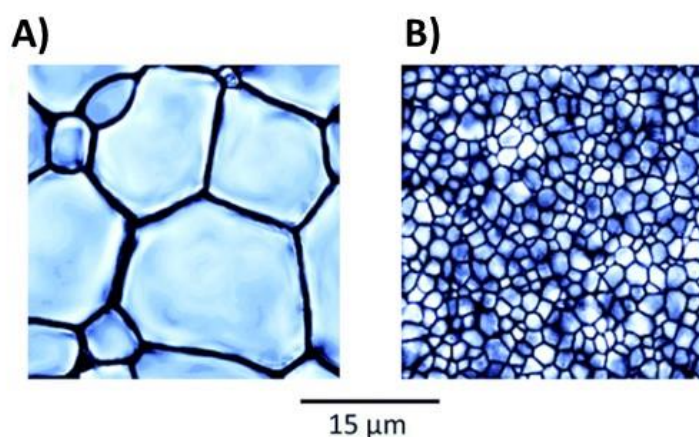


Figura 6. Demonstração do processo de IRI. Em soluções contendo AFPs/AFGPs, é possível observar a ausência de grandes cristais de gelo. (A): solução sem AFPs/AFGPs. (B): solução com AFPs/AFGPs. (Fonte: adaptado de CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

1.4.3. Diversidade estrutural e funcional de AFPs/AFGPs

Como citado anteriormente, AFPs/AFGPs são encontradas em diversos organismos. Diversos tipos de estruturas já foram identificados em AFPs/AFGPs. Em peixes, estas proteínas variam em massa molecular (3 a 33 kDa) e estruturas secundárias, podendo adquirir conformações com predominância de α -hélices, folhas- β e estruturas desordenadas (*random coils*). As AFPs/AFGPs de peixes são classificadas em cinco tipos, nomeados de AFGPs, AFP-I, AFP-II, AFP-III e AFP-IV (MIDDLETON *et al.*, 2012; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013). As AFGPs contêm 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 α -hélices. As AFPs-II são proteínas ricas em pontes de dissulfeto e contêm regiões mistas entre as estruturas secundárias de α -hélices e folhas- β . Além disto, as AFPs desta classe são estruturalmente globulares. As AFPs-III são ricas em curtas estruturas de folhas- β e as AFPs-IV são proteínas com feixes helicoidais e ricas em resíduos de alanina (GRAETHER *et al.*, 2000; KANDASWAMY *et al.*, 2011; CAPICCIOTTI *et al.*, 2013).

Em detrimento dessa vasta diversidade estrutural, as propriedades das AFPs/AFGPs são extremamente variáveis dentre os organismos, sendo que algumas são classificadas como hiperativas e outras como moderadamente ativas. As AFPs/AFGPs hiperativas, via de regra,

são aquelas que, além de possuírem a capacidade de se ligar ao plano prisma (**Figura 4**), possuem habilidade de se ligar também ao plano basal dos cristais. Sendo assim, a associação de AFPs/AFGPs em mais de um único plano promove um acentuado retardamento do crescimento dos cristais de gelo e, portanto, aumenta a atividade de TH destas proteínas. Normalmente, esta classe de proteínas é encontrada em espécies denominadas não como tolerantes, mas sim como resistentes ao frio, e são capazes de diminuir a temperatura de congelamento na faixa de 2 a 13 °C, embora a atividade IRI das mesmas seja extremamente baixa. Contrariamente, as AFPs/AFGPs moderadamente ativas são aquelas que, exclusivamente, são capazes de se ligar apenas ao plano prisma e estão presentes em organismos tanto denominados resistentes quanto naqueles denominados tolerantes ao congelamento. Tipicamente, apresentam uma atividade TH mais reduzida (até 2 °C), sendo todas as AFPs vegetais classificadas neste grupo, com raras exceções (MIDDLETON *et al.*, 2012; BREDOW *et al.*, 2017b). Dentre todas as AFPs/AFGPs, incluindo as hiperativas e moderadamente ativas, as proteínas derivadas de plantas possuem as menores taxas de TH (0,1 - 0,5 °C) e as maiores atividades de IRI (GRIFFITH & YAISH, 2004; GUPTA & DESWAL, 2014; BREDOW *et al.*, 2017b).

1.4.4. AFP/AFPGs em plantas

As AFPs/AFGPs foram identificadas em diversas espécies de plantas, como pode ser visualizado na **Tabela 2**. 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; MARENTES *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 T_f da região do apoplasto é maior do que a T_f do citosol. Sendo assim, as formações dos cristais de gelo iniciam-se no exterior das células e, portanto, as AFPs/AFGPs teriam a função de impedir a formação de gelo extracelularmente (**Figura 7**). Contudo, em alguns tipos de AFPs/AFGPs, não foram identificadas sequências de aminoácidos referentes aos peptídeos-sinais de exportação ao apoplasto, sugerindo que estas proteínas são secretadas por vias designadas não clássicas ou, ainda, podem também desempenhar suas atividades de anticongelamento no citosol (DENG *et al.*, 2014; BREDOW *et al.*, 2017b).

Tabela 2: Proteínas anticongelantes identificadas em espécies de plantas

Proteína	Planta de origem	Atividade anticongelante	Similaridade	Referência
LU-AFP, CHT-AFP, TLP-AFP	<i>Secale cereale</i>	TH = 0,03°C à 0,1 mg/mL	β-1,3-endoglucanases; Endoquitinase da classe I; Endoquitinase da classe II; Proteínas do tipo taumatina	HON <i>et al.</i> , 1994; HON <i>et al.</i> , 1995; YEH <i>et al.</i> , 2000
STHP-64	<i>Solanum dulcamara</i>	TH = ~ 0,3°C à >30 mg/mL; Altos níveis de IRI	Fator de transcrição WRKY	DUMAN, 1994; HUANG & DUMAN, 2002
DcAFP	<i>Daucus carota</i>	TH = 0,35°C à >1 mg/mL; Altos níveis de IRI	Proteína inibidora da enzima Poligalacturonase	WORRALL <i>et al.</i> , 1998; SMALLWOOD <i>et al.</i> , 1999
LpAFP, LpIRI2/3	<i>Lolium perenne</i>	TH = ~ 0,3°C à 1,5 mg/mL; Altos níveis de IRI	Receptor quinase de fitossulfoquina	SIDEBOTTOM <i>et al.</i> , 2000; BREDOW <i>et al.</i> , 2016a
AmAFP	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	TH = 0,15°C à 5 mg/mL e 0,35°C à 10 mg/mL; Atividade IRI identificada	Agglutinina	FEI <i>et al.</i> , 2001; WANG <i>et al.</i> , 2003; FEI <i>et al.</i> , 2008
FsAFP	<i>Forsythia suspensa</i>	Atividade IRI identificada sob baixas concentrações de proteína (6 µg/mL)	Proteínas do tipo desidrinas	SIMPSON <i>et al.</i> , 2005
TaIRI1-2	<i>Triticum aestivum</i>	Alta atividade IRI	Proteínas do tipo taumatina	KONTOGIORGOS <i>et al.</i> , 2007
BiCHT-1	<i>Bromus inermis</i>	TH e IRI não informadas ou identificadas	Quitinase	NAKAMURA <i>et al.</i> 2008
RsAFP	<i>Raphanus sativus</i>	TH = ~0,2 °C à 40 µg/mL; Atividade IRI identificada	Não reportado	KAWAHARA <i>et al.</i> , 2009
PaAFP	<i>Picea abies</i>	TH = 2,19 °C à 400 µg/mL	Quitinase	JARZABEK <i>et al.</i> , 2009
PpAFP	<i>Picea pungens</i>	TH = 2,02 °C à 400 µg/mL	Quitinase	JARZABEK <i>et al.</i> , 2009
AnAFP	<i>Ammopiptanthus nanus</i>	TH = 0,46 °C a 20 mg/mL	Proteína dependente de K ⁺ transportadora de Na ⁺ /Ca ⁺²	YU <i>et al.</i> , 2009; LU <i>et al.</i> , 2010
CpCHT-AFP	<i>Chimonanthus praecox</i>	TH = 0,52°C à 1,5 mg/mL	Endoquitinase da classe I	ZHANG <i>et al.</i> , 2011
LIAFP1-3	<i>Ligustrum lucidum</i>	TH = 0,38 - 0,68°C à 5 mg/mL	Não reportado	CAI <i>et al.</i> , 2011
HrCHT-1a/b	<i>Hippophae rhamnoides</i>	TH = 0,19°C à 0,2 mg/mL; Alta atividade IRI	Endoquitinase da classe I	GUPTA & DESWAL, 2012
BaAFP-1	<i>Hordeum vulgare</i> L.	TH = 1,04°C à 18 mg/mL	Proteína inibidora de α-amilase	DING <i>et al.</i> , 2015
BdIRI1-7	<i>Brachypodium distachyon</i>	TH = ~0,15°C à 0,5 mg/mL; Alta atividade IRI	Receptor quinase de fitossulfoquina	BREDOW <i>et al.</i> , 2016

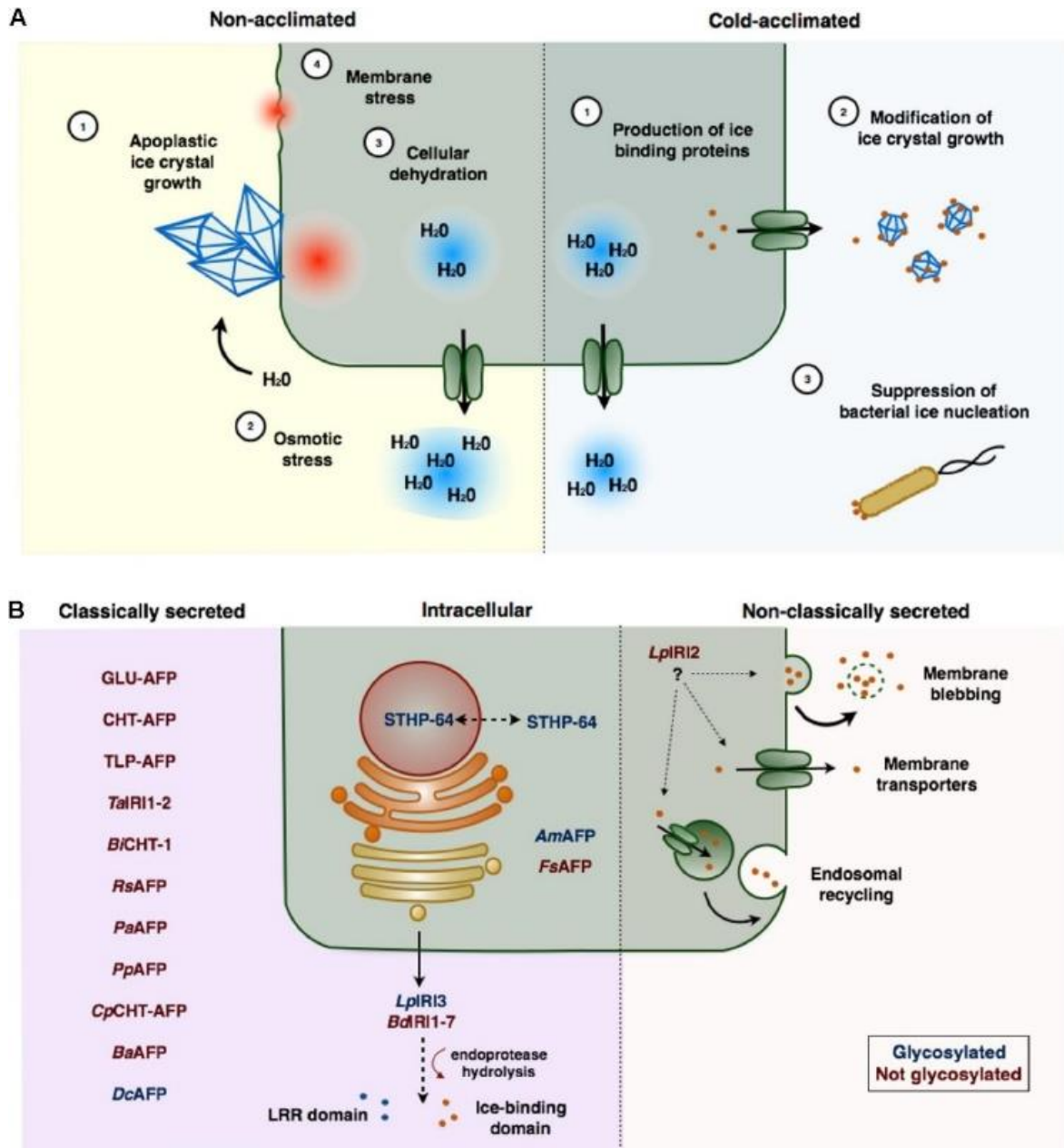


Figura 7. Danos causados pela formação de cristais de gelo no meio extracelular, vias de secreção, modificações pós-traducionais e mecanismo de ação de AFPs/AFGPs para promover tolerância ao congelamento em plantas. (A; esquerda): Na ausência de AFPs/AFGPs, grandes cristais de gelo formados no apoplasto das células vegetais podem causar severos danos às membranas celulares (1). Conforme as moléculas de água migram em direção aos cristais de gelo, o gradiente osmótico é formado devido à falta de disponibilidade de água no estado líquido no meio extracelular (2). O estresse osmótico promove a migração de moléculas de água de dentro para fora da célula, promovendo a desidratação celular (3). A diminuição do volume celular pode promover a ruptura ou o colapso das células (4). **(A; direita):** O processo de aclimação ao frio induz a expressão de AFPs/AFGPs (1). Esta classe de proteínas é secretada ao apoplasto e, uma vez no meio extracelular, são capazes de se ligar aos pequenos cristais de gelo formados e impedir o crescimento e a expansão dos mesmos (2). Além disto, algumas AFPs/AFGPs também são capazes de evitar o congelamento associando-se com proteínas que promovem a formação de cristais de gelo (INPs, do inglês, *ice nucleation proteins*) derivadas de micro-organismos presentes em tecidos vegetais (3). **(B):** A grande maioria das

AFPs/AFGPs contêm peptídeos-sinais de endereçamento ao apoplasto via retículo endoplasmático e aparato de Golgi. Dentre estas, LpIRI3 e BdIRI1-7 são hidrolisadas na sua porção N-terminal, liberando a repetição rica em leucinas (LRR, do inglês, *leucine rich repeat*) do domínio de ligação aos cristais de gelo. LpIRI2 é um caso particular e não possui peptídeo-sinal de exportação ao apoplasto. Portanto, ela é provavelmente secretada ao exterior da célula por meio de vias denominadas não clássicas. Diferentemente das demais proteínas, AmAFP, STHP-64 e FsAFP aparentemente localizam-se intracelularmente e desempenham suas funções dentro das células. Na Figura, proteínas glicosiladas estão indicadas em vermelho e proteínas não glicosiladas estão indicadas em azul. A nomenclatura das proteínas está de acordo com a Tabela 2. (Fonte: BREDOW *et al.*, 2017b).

Em plantas, pouco se conhece a respeito das estruturas de AFPs/AFGPs. Segundo KANDASWAMY *et al.* (2011), nenhuma AFPs/AFGPs de plantas havia sido cristalizada até o ano de 2010. MIDDLETON *et al.* (2012), por meio de cristalografia de raios-X, obtiveram a primeira estrutura tridimensional de uma AFP vegetal. Derivada da espécie *Lolium perenne*, a proteína LpIRI apresenta a estrutura secundária rica em folhas- β e, além disto, uma conformação tridimensional denominada de hélice- β na qual está localizado* o domínio de ligação aos cristais de gelo. Embora poucos dados estejam disponíveis em relação à estrutura tridimensional de AFPs/AFGPs de plantas, de acordo com a sequência primária de aminoácidos e com o uso de ferramentas de bioinformática, diversas predições de estruturas secundárias 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- β , em 7 foram identificadas estruturas em α -hélices e em 5 foram identificadas ambas as estruturas. Segundo GUPTA & DESWAL (2014), as AFPs/AFGPs de plantas são ricas em estruturas secundárias do tipo folhas- β mas, apesar disto, estas proteínas, a princípio, não compartilham homologia entre si e podem ter evoluído independentemente ao longo do processo de 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. Neste contexto, a introdução em plantas dos genes que as codificam, por meio da engenharia genética, é uma das possibilidades de obtenção de plantas mais tolerantes às geadas.

1.5. Engenharia Genética e Biotecnologia Vegetal

A biotecnologia, associada às técnicas convencionais de melhoramento genético, vem destacando-se como importante instrumento para o aumento da produtividade, uma vez que poderá ser usada para a obtenção de árvores com características específicas como a resistência a insetos e doenças; a melhoria na capacidade fotossintética e, conseqüentemente, no crescimento das plantas; a melhor forma, maior densidade ou maior quantidade de fibras; a tolerância a herbicidas e ao estresse abiótico incluindo baixas temperaturas e geadas (CAPO, 2015). Entretanto, segundo o Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia (2018; ISAAA, do inglês, *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications*), não existem plantas transgênicas comercialmente disponíveis tolerantes às baixas temperaturas. Portanto, a busca por novos genes-alvo que possam conferir a tolerância desejada é de extrema valia. Segundo DUMAN & WISNIEWSKI, (2014), a utilização de AFPs/AFGPs é uma alternativa interessante para a obtenção de cultivares de valor agrônômico. Além disto, o emprego desta classe de proteínas em arbóreas com aplicações comerciais é uma abordagem promissora, incluindo plantas de *Eucalyptus* sensíveis às geadas.

1.5.1. Métodos Alternativos para a Obtenção de Plantas Expressando Genes de Interesse

Dentre as abordagens convencionais de transformação genética de plantas, os métodos mediados por agrobactérias e biobalística apresentam destaque pelo recorrente uso em diversas espécies vegetais. Entretanto, esses métodos empregados são, muitas vezes, ineficientes para algumas cultivares de interesse agrônômico e arbóreas florestais. A instabilidade de transgenes, os baixos títulos de DNA entregues às células vegetais via agrobactérias, a limitada precisão do bombardeamento de DNA aos explantes vegetais e as longas etapas de cultivo e regeneração de tecidos vegetais são alguns exemplos dos problemas e limitações destas técnicas (ALTPETER *et al.*, 2016). Neste contexto, a transformação genética de plantas de *Eucalyptus* vem encontrando diversos desafios. Tecidos derivados de plantas adultas são recalcitrantes ao processo de micropropagação *in vitro*. Além disto, a vitrificação, caracterizada pelo material com aparência translúcida, folhas espessas e reduzida diferenciação tecidual, é frequentemente observada (CHAUHAN *et al.*, 2014). Desta maneira,

o emprego das técnicas convencionais de transformação genética é limitado à apenas algumas espécies e genótipos de *Eucalyptus* (GIRIJASHANKAR, 2011).

Sendo assim, devido ao número bastante reduzido de protocolos de transformação genética e de regeneração de plantas transgênicas de *Eucalyptus* disponíveis na literatura científica, métodos alternativos, eficazes em todas as espécies e genótipos, para promover a expressão de genes de interesse são extremamente importantes. Dessa forma, justamente por não necessitar de etapas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, vetores plasmidiais contendo sequências derivadas de vírus, como por exemplo, aqueles da série IL-60, tornam-se uma alternativa interessante para este propósito.

O Sistema IL-60 é derivado do genoma do vírus do frisado amarelo do tomateiro, ou TYLCV (do inglês, *Tomato Yellow Leaf Curl Virus*), geminivírus de ssDNA monopartido (PERETZ *et al.*, 2007). IL-60 é baseado em um vírus modificado que pode ser mecanicamente administrado nas raízes ou nos caules das plantas. Por meio da deleção e mutação de sequências gênicas do vírus relacionadas aos sintomas da doença, a administração do plasmídeo nos tecidos vegetais é inócua para as plantas. O vetor é capaz de se replicar e permanecer de maneira episossomal nas células vegetais. Além disto, as regiões essenciais para expressão gênica e para o movimento, por meio dos tecidos vasculares das plantas, foram mantidas. Portanto, utilizando as propriedades mencionadas, genes de interesse biotecnológico podem ser diretamente introduzidos nos tecidos vegetais e, eventualmente, serão expressos sistematicamente e de maneira estável durante o ciclo de vida das plantas. Em trabalhos mais recentes, o sistema tem sido aperfeiçoado e somente as regiões mínimas do genoma de TYLCV, essenciais para a funcionalidade do plasmídeo, foram mantidas, resultando em duas versões plasmidiais nomeadas de pIR e p1470. O vetor p1470 funciona como auxiliar (*helper plasmid*) e é o responsável pela manutenção, replicação e movimentação de pIR, assim permitindo a expressão de genes de interesse em locais distantes do sítio de inoculação, ao passo que o segundo vetor, intitulado pIR, é o portador do(s) gene(s) de interesse (GOVER *et al.*, 2014).

O p1470 contém a região intergênica (IR), a qual funciona como origem de replicação e promotor bidirecional, e as ORFs V1 e V2, cujas proteínas codificadas são necessárias para a movimentação do vetor pIR. O pIR, por sua vez, também possui a região IR, a jusante da qual é introduzido o gene de interesse (**Figura 8**). Por apresentar a funcionalidade como promotor, a IR permite a expressão de genes exógenos, mas essa ocorre apenas de modo

basal, nas primeiras células na qual o vetor foi introduzido. Do mesmo modo, por sua ação como origem de replicação, permite o aumento do número de cópias do vetor, de modo local. Para que o pIR seja propagado para outras células e para que o gene de interesse seja expresso em locais distantes do sítio de inoculação, é necessária a presença das proteínas V1 e V2, produzidas a partir do vetor auxiliar (PERETZ *et al.*, 2007; GOVER *et al.*, 2014; BIANCHIN, 2018 – dados não publicados).

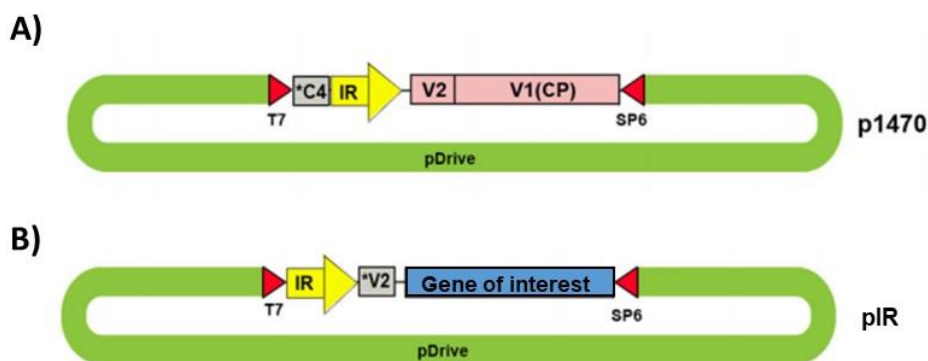


Figura 8. Vetores pIR e p1470 da plataforma IL-60. Os vetores apresentam apenas as regiões mínimas do genoma do TYLCV que são essenciais para o movimento, replicação e expressão de genes de interesse. *C4: versão do gene C4 (associado com aparecimento do sintomas da infecção do TYLCV em plantas) contendo apenas a sequência codificadora da porção N-terminal da proteína; IR: origem de replicação e promotor bidirecional; V1 e V2: genes codificadores de proteínas associadas ao DNA relacionadas com a estabilidade e movimentação do plasmídeo nos tecidos vegetais; *V2: versão do gene V2 contendo apenas a sequência codificadora da porção N-terminal da proteína (Fonte: adaptado de GOVER *et al.*, 2014).

A tecnologia foi patenteada e é de propriedade da empresa israelense Morflora (<http://www.moreflora.com/>) sob o nome *TraitUp*TM. Embora a tecnologia tenha sido testada com sucesso em diversas famílias botânicas, incluindo espécies lenhosas como videiras, oliveiras e citros, não existem relatos sobre o emprego destes plasmídeos em plantas de *Eucalyptus*.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, é escasso o número de genes que potencialmente podem conferir tolerância em plantas às condições de baixas temperaturas. Deste modo, devido à ausência da tolerância referida e os danos que este estresse causa em plantas do gênero *Eucalyptus*, há uma enorme necessidade do desenvolvimento de linhagens de *Eucalyptus* com potenciais genes que possam conferir tolerância às geadas. Neste contexto, plantas de *A. thaliana* poderiam ser utilizadas como modelos para avaliar o potencial dos genes em conferir a tolerância pretendida.

Além disto, a aplicação de metodologias alternativas aos meios convencionais de transformação genética, baseada em agrobactérias e biobalística, como por exemplo os vetores plasmidiais contendo elementos derivados de vírus, são de grande valia, uma vez que permitem a expressão de sequências de interesse de maneira facilitada, rápida e episomal, sem haver a necessidade de etapas de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Desta maneira, o emprego do método poderá potencialmente auxiliar na obtenção de variedades de *Eucalyptus* tolerantes às geadas.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal que norteou o desenvolvimento do presente estudo foi avaliar a capacidade de genes sintéticos em conferir a tolerância às geadas/congelamento em plantas.

3.1. Objetivos Específicos

3.1.1. Revisar a literatura científica e selecionar sequências codificadoras de proteínas potencialmente capazes de conferir a tolerância ao congelamento em plantas, bem como de sequências promotoras responsivas às baixas temperaturas.

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

3.1.3. Adaptar os genes sintéticos a plasmídeos binários e transformar *A. tumefaciens* com os mesmos.

3.1.4. Adaptar as sequências codificadoras das proteínas DaRIP1, AnAFP e GFP ao plasmídeo “vegetal” derivado de vírus p28_35S_Gateway.

3.1.5. Transformar geneticamente plantas de *A. thaliana* via *A. tumefaciens* contendo os genes de interesse e inocular as versões recombinantes de p28_35S_Gateway em *Eucalyptus*.

3.1.6. Realizar análises moleculares de PCR, RT-qPCR e *western blot* em plantas transgênicas de *A. thaliana* e *Eucalyptus* inoculadas com versões recombinantes de p28_35S_Gateway.

3.1.8. Realizar ensaios de tolerância ao congelamento em plantas transgênicas de *A. thaliana* e *Eucalyptus* inoculadas com as versões recombinantes de p28_35S_Gateway.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Revisão Bibliográfica e Busca na Literatura Científica por Sequências Gênicas de Interesse

Com base em trabalhos recentes publicados na literatura científica, realizamos buscas nas plataformas *PubMed* e *Google Scholar* por sequências promotoras responsivas ao frio e sequências codificadoras de proteínas potencialmente capazes de conferir a tolerância às geadas ou ao congelamento em plantas. As sequências promotoras foram analisadas e selecionadas com base em artigos científicos que demonstraram que as mesmas foram capazes de induzir a transcrição de genes repórteres somente em condições de baixas temperaturas. As sequências codificadoras de proteínas foram analisadas e selecionadas de acordo com trabalhos que comprovaram, por meio da superexpressão de genes-alvo, o aumento de tolerância ao congelamento em plantas-modelo ou com base em dados de transcriptoma e proteômica, evidenciando o aumento nos níveis de mRNA e proteínas relativas a um determinado gene candidato em plantas tolerantes às baixas temperaturas quando submetidas ao estresse.

As sequências promotoras e codificadoras definidas foram agrupadas em dois diferentes genes sintéticos, juntamente com a sequência terminadora do gene codificador da enzima nopalina sintase (*nos*) de *A. tumefaciens*. Para a realização de futuras etapas de rearranjo entre as sequências promotoras e codificadoras de ambos os genes, sítios de reconhecimento e hidrólise pelas enzimas de restrição NcoI e BamHI foram inseridos a montante da 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 genes sintéticos 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 ligadas ao vetor plasmidial pUC57.

4.2. Análises *in Silico*

Os mapas representativos dos vetores plasmidiais foram projetados com o uso da ferramenta *SnapGene* 2.8 (disponível em <http://www.snapgene.com/>). As análises e buscas

por elementos *cis*-atuantes de DNA em potenciais sequências 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>). As ferramentas *SnapGene* 2.8 e 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) foram utilizadas para os alinhamentos aos pares entre os produtos resultantes das reações de sequenciamento de DNA e as sequências originais dos genes sintéticos.

4.3. Etapas de Clonagem Molecular

4.3.1. Confirmação da presença dos genes *P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}* e *P_{pbec1}-AnAFP-T_{nos}* no vetor pUC57

Os cassetes gênicos sintéticos provenientes da empresa GenScript e ligados ao vetor pUC57 foram entregues na forma de plasmídeos purificados e absorvidos em papel-filtro (4 µg). Os ácidos nucleicos foram eluídos com 200 µL de tampão Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH 8 (TE) em microtubos do tipo *Eppendorf* e permaneceram *overnight* (*o/n*) a 4 °C. Um µL de cada alíquota dos plasmídeos recombinantes eluídos foi utilizado para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli* OmniMax2. As células de *E. coli* foram preparadas essencialmente conforme protocolo descrito em INOUE *et al.* (1990). O procedimento de transformação genética foi realizado por choque térmico como descrito em GREEN & SAMBROOK (2012).

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 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 L-B líquido contendo 100 mg/L de ampicilina. As culturas foram mantidas *o/n* a 37 °C e a 180 rotações por minuto (rpm) em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). A seguir, as preparações de plasmídeos foram realizadas utilizando-se o método de lise alcalina descrito por BIMBOIM & DOYLE (1979) com

alterações propostas por STEPHEN *et al.* (1990). Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 20 µL de TE e posteriormente quantificados no equipamento *NanoDrop* 2000c (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

Para a constatação de que os plasmídeos preparados continham os genes de interesse, 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-HCl a 40 mM, ácido acético a 20 mM e EDTA a 1 mM, pH 8 (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 genes sintéticos foi feita por sequenciamento de DNA plasmidial. *Primers* específicos foram projetados baseados nas sequências promotoras e codificadoras de proteínas descritas por TITTARELLI *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 3** estão indicados todos os *primers* utilizados no presente estudo. As sequências projetadas foram sintetizadas pela empresa Integrated DNA Technologies (EUA). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS).

Tabela 3: Primers utilizados neste trabalho para PCRs e sequenciamentos de DNA

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Temperatura média de anelamento (T _m ; °C)
<i>P_{COR15B}-Forward</i>	CACCTCCAAGCTTTAAATAATGAGTAATTATAAG	34	50,7
<i>P_{Ppbec1}-Forward</i>	CACCATCTCTATTTACTAGAGTCTTTTTCC	31	50,7
<i>T_{nos}-Reverse</i>	CCCGATCTAGTAACATAGATGA	22	50,7
<i>P_{COR15B-245/224}-Reverse</i>	AGTGGATCAATGTTGATTACAA	22	50,0
<i>P_{COR15B-933/954}-Forward</i>	CATAGAAATGGTTACACGTAAC	22	49,2
<i>P_{Ppbec1-234/209}-Reverse</i>	CTTACTTCTTTGTTTTATTCTTGCA	26	50,2
<i>P_{Ppbec1-570/588}-Forward</i>	TTTGAGAAGGGTCATGCTA	19	50,7
<i>DalRIP1-229/213-Reverse</i>	GTAGCTGCAACGTAGTG	17	50,3
<i>DalRIP1-446/469-Forward</i>	TAATTGGGAGTGACAATATCATAA	24	49,7
<i>DalRIP1-p28-Forward</i>	CACCATGGCGCTGAAATGCGG	21	56,8
<i>DalRIP1-p28-Reverse</i>	TTAACCTCCTGTCACGACTTTGT	23	56,1
<i>AnAFP-p28-Forward</i>	CACCATGGCAGGTATCATCAACA	23	51,2
<i>AnAFP-p28-Reverse</i>	CTAGTCACTGTCACTGCTG	19	52,4
<i>AnAFP-259/241-Reverse</i>	CATCACCTTGTAAATCACC	19	50,5
<i>AnAFP-380/399-Forward</i>	ATTACAAGGGTGAAAACACG	20	50,8
<i>T_{nos}30/48-Forward</i>	AAGATTGAATCCTGTTGCC	19	50,4
<i>M13 (-21)-Forward</i>	TGTA AACGACG GCCAGT	18	54,4
<i>M13-Reverse</i>	CAGGAAACAGCTATGACC	18	50,1

4.3.2. Isolamento dos cassetes gênicos do vetor pUC57

Os cassetes gênicos sintéticos 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.

Os fragmentos referentes aos genes de interesse 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 μL da solução de cada fragmento purificado foi aplicado em gel de agarose a 0.8% e corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 65 mA conforme citado em 4.3.1. Os fragmentos purificados foram quantificados no equipamento *NanoDrop 2000c*.

4.3.3. Inserção dos genes sintéticos no plasmídeo binário pCAMBIA2300

Para o recebimento dos genes de interesse, o plasmídeo binário pCAMBIA2300 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; CAMBIA) foi também hidrolisado com a enzima de restrição HindIII ou com a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI (Promega). Posteriormente, as extremidades hidrolisadas do plasmídeo pCAMBIA2300 foram desfosforiladas utilizando-se a enzima fosfatase alcalina de intestinos de bezerros (CIAP, do inglês, *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*; Promega) seguindo as instruções do fabricante. Um μL de cada produto das reações de desfosforilação foi aplicado em gel de agarose a 0.8% e corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 110 mA conforme citado no Item 4.3.1. Por fim, as versões linearizadas e desfosforiladas do plasmídeo pCAMBIA2300 foram quantificados em *NanoDrop 2000c*.

Posteriormente, os fragmentos referentes aos cassetes gênicos sintéticos (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foram ligados ao plasmídeo binário pCAMBIA2300 (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) previamente hidrolisado e com as extremidades desfosforiladas utilizando-se a enzima T4 DNA-Ligase (Promega) e seguindo as instruções informadas pelo fabricante. Na **Figura 9A** está demonstrado o mapa do plasmídeo pCAMBIA2300. Células de *E. coli* OmniMax2 foram transformadas geneticamente, conforme descrito previamente, com 10 μL dos produtos resultantes das reações de ligação. A seguir, 100 μL e 200 μL 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 preparações plasmidiais.

Para averiguar a natureza dos plasmídeos recombinantes, as amostras de DNA plasmidial do plasmídeo pCAMBIA2300 contendo os genes de interesse foram submetidas a

reações de hidrólise utilizando-se a enzima de restrição HindIII e a combinação entre as enzimas HindIII e EcoRI, respectivamente, seguida de eletroforese em gel de agarose (Item 4.3.1.).

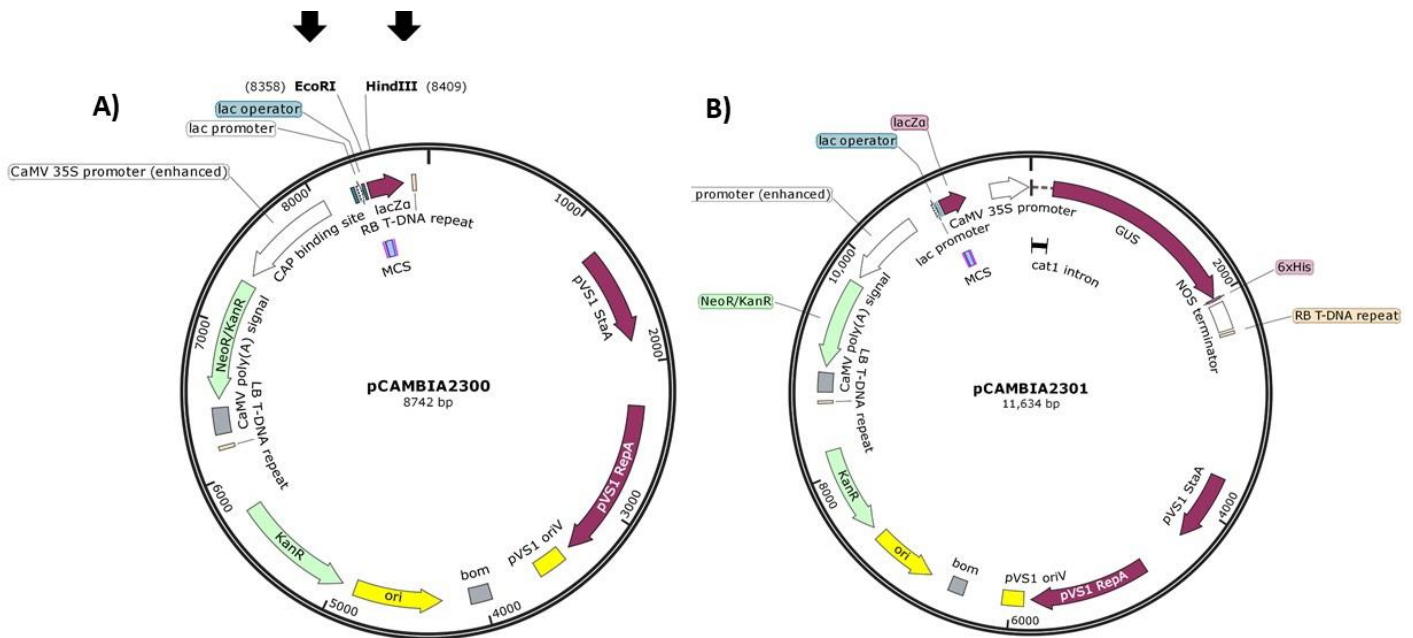


Figura 9. Mapa dos plasmídeos binários pCAMBIA2300 e pCAMBIA2301. Nas imagens, é possível identificar os elementos dos plasmídeos esquematizados: a origem de replicação (*ori*); o gene de resistência à canamicina (KanR); a região operadora do gene *lac* (*lac operator*); ao região promotora de *lac* (*lac promoter*); o gene que codifica a proteína β-galactosidase (*lacZα*); a origem de replicação referente ao organismo mutante *Pseudomonas aeruginosa* resistente a vanádio (pVS1 RepA); a região de estabilidade do genoma do organismo mutante *P. aeruginosa* resistente a 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 pelo gene de resistência à neomicina e derivados, como a canamicina, em plantas (NeoR/KanR) sob regulação do promotor 35S CaMV; o sítio de multiclonagem (MCS); o sinal de poliadenilação do CaMV [CaMV *poly(A) signal*]. Além destes elementos, o vetor pCAMBIA2301 (**Imagem B**) contém no T-DNA o gene repórter codificador da proteína β-glicuronidase (*gusA*); o íntron-1 do gene codificador da proteína catalase de *Ricinus communis* (*cat1 intron*); a cauda (*tag*) contendo 6 resíduos do aminoácido histidina (6xHis). As setas em preto (**Imagem A**) 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 3). O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene conforme citado no Item 4.3.1.

4.3.4. Isolamento das sequências codificadoras das proteínas DaIRIP1 e AnAFP do plasmídeo pUC57

As sequências codificadoras *DaIRIP1* e *AnAFP* foram isoladas do plasmídeo pUC57 por meio de PCR com o uso do termociclador LGC (XP Cyclor). Os programas das reações estão representados nas Tabelas 4 e 5. Os componentes e quantidades da PCR foram: água ultrapura (37,5 µL); 10x *Pfu Buffer* acrescido de MgSO₄ (5 µL; Promega); 5 mM de dNTP's, do inglês, *deoxyribonucleotide triphosphates* (2 µL); 10 mM de *primer Forward* (1,5 µL; *DaIRIP1-Forward-p28* ou *AnAFP-Forward-p28*); 10 mM de *primer Reverse* (1,5 µL; *DaIRIP1-Reverse-p28* ou *AnAFP-Reverse-p28*); 2,5 U/µL de *Pfu* DNA polimerase (0,5 µL; Promega); 20 ng/µL de DNA plasmidial (1 µL; pUC57-*P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}* ou *P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}*). Foram aplicados 5 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 a 65 mA conforme citado em 4.3.1.

Tabela 4. Programa do termociclador para PCR com vistas a amplificar a sequência codificadora de *DaIRIP1*

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	55	1 min	30
Extensão	72	1 min	30
Extensão final	72	15 min	1

Tabela 5. Programa do termociclador para PCR com vistas a amplificar a sequência codificadora de *AnAFP*

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	51	1 min	30
Extensão	72	1 min	30
Extensão final	72	15 min	1

4.3.5. Inserção das sequências codificadoras das proteínas *DaIRIP1*, *AnAFP* e *GFP* no plasmídeo *p28_35S_Gateway*

Os *amplicons* referentes às sequências *DaIRIP1* e *AnAFP* foram inseridas no plasmídeo pENTR/D-TOPO com o auxílio da enzima topoisomerase utilizando-se o *kit* de clonagem molecular pENTRTM/D-TOPOTM (ThermoFisher Scientific) e seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante. Os componentes e quantidades das reações foram: água ultrapura (3,5 µL); solução salina (1 µL); 10 ng/µL de *amplicon* (0,5 µL; *DaIRIP1* ou *AnAFP*); 20 ng/µL de pENTR/D-TOPO (1 µL). As reações permaneceram incubadas 5 min à temperatura ambiente. Células de *E. coli* OmniMax2 foram transformadas geneticamente, conforme descrito no Item 4.3.1, com 2 µL dos produtos resultantes das reações de ligação. A seguir, as células foram centrifugadas e o excesso de sobrenadante foi descartado. As suspensões de células concentradas 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 previamente, foram realizadas preparações plasmidiais. Para a confirmação da inserção das sequências codificadoras de *DaIRIP1* e *AnAFP* em pENTR/D-TOPO, as amostras de DNA plasmidial foram submetidas a reações de hidrólise utilizando-se a enzima de restrição *NcoI*.

Por fim, por meio de uso do *kit* de clonagem molecular *GatewayTM LR ClonasseTM II Enzyme Mix* (ThermoFisher Scientific), os plasmídeos recombinantes pENTR/D-TOPO-

DaIRIP1, pENTR/D-TOPO-*AnAFP* e pENTR3c-*gfp* foram recombinados com o plasmídeo p28_35S_Gateway via enzima LR clonase e seguindo as especificações do fabricante. Os componentes e quantidades das reações foram: 150 ng/μL de pENTR/D-TOPO-*DaIRIP1* ou pENTR/D-TOPO-*AnAFP* ou pENTR3c-GFP (1 μL); 150 ng/μL de p28_35S_Gateway (1 μL); TE (6 μL); 2 μL do *mix* de LR clonase. As amostras permaneceram incubadas a 25 °C *o/n*. Por fim, as reações foram tratadas com proteinase K a 2,5 μg/μL (1μL) e incubadas a 37 °C por 10 min. Células de *E. coli* OmniMax2 foram transformadas geneticamente com 3 μL dos produtos resultantes das reações de recombinação. A seguir, as células foram centrifugadas e o excesso de sobrenadante foi descartado. As suspensões de células concentradas foram distribuídas em meio L-B sólido contendo 100 mg/L de ampicilina. As colônias obtidas foram inoculadas em 1,5 mL de meio L-B líquido contendo 100 mg/L de ampicilina 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 preparações plasmidiais. Para a confirmação da inserção das sequências codificadoras de *DaIRIP1*, *AnAFP* e GFP em p28_35S_Gateway, as amostras de DNA plasmidial foram submetidas a reações de hidrólise utilizando-se as enzimas de restrição HindIII ou XhoI (Promega).

O vetor p28_35S_Gateway é uma versão do plasmídeo vegetal pIR (da série IL-60; GOVER *et al.*, 2014) derivado do genoma do TYLCV. A versão p28_35S_Gateway foi adaptada à tecnologia *Gateway* (ThermoFisher Scientific) por pesquisadores da Embrapa Uva & Vinho de Bento Gonçalves, RS (Dr. Luís Fernando Revers, comunicação pessoal). Do mesmo modo como pIR, a versão *Gateway* do plasmídeo apresenta os elementos IR e *Amp^R* (gene de seleção de resistência frente à ampicilina em bactérias). Contudo, a região na qual os fragmentos de DNA são inseridos permanece sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S CaMV) e do terminador *nos*. Deste modo, os genes de interesse são expressos de maneira constitutiva.

4.4. Transformação Genética de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

Linhagens desarmadas de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas geneticamente via choque térmico com o plasmídeo pCAMBIA2300 contendo os genes de interesse. Paralelamente, as células de *A. tumefaciens* EHA105 também foram transformadas com o plasmídeo binário pCAMBIA2301 (**Figura 9B**), na qual as plantas transformadas com as

versões de agrobactérias contendo este plasmídeo foram utilizadas como grupos de controle positivo e negativo nas etapas de transformação genética de plantas e ensaios de congelamento, respectivamente. As transformações genéticas foram realizadas seguindo o protocolo e as orientações publicadas por BRASILEIRO & CARNEIRO (1998). As suspensões de células transformadas foram distribuídas em meio L-B sólido contendo 50 mg/L de rifampicina e 50 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 *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *A. thaliana* do ecotipo Columbia-0 (Col-0) foram estratificadas em microtubos de 1,5 mL com a adição de 1 mL de solução de agarose a 0,1% autoclavada. Os microtubos foram protegidos da luz, embrulhando-os em papel alumínio, e mantidos por 4 dias a 4 °C. Posteriormente, alíquotas de 10 µL da suspensão de sementes foram depositadas no centro e nas regiões laterais 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; 22 °C) para germinação das sementes. Após a germinação, as três 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 células de *A. tumefaciens* *EHA105::pCAMBIA2300-P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}*, *A. tumefaciens* *EHA105::pCAMBIA2300-P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}*. e *A. tumefaciens* *EHA105::pCAMBIA2301*. Como controle das etapas de transformação genética, suspensões de *A. tumefaciens* *EHA105::pCAMBIA2301* foram também utilizadas na transformação genética 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 siliquis e produção de sementes.

Os procedimentos de coleta e antissepsia 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 para a seleção de sementes transgênicas T1. 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 a sala de cultivo vegetal sob condições normais de crescimento. Tanto sementes transgênicas quanto não-transgênicas foram capazes de germinar em meio seletivo contendo canamicina. Porém, as plântulas não transformadas não foram capazes de manter seu desenvolvimento e crescimento após 14 dias de cultivo *in vitro* e apresentaram sintomas de clorose. Em contrapartida, plântulas transgênicas foram capazes de se desenvolver normalmente em meio seletivo, apresentando a coloração verde intensa, além do desenvolvimento de raízes e de folhas verdadeiras. Plântulas com fenótipos de resistência à canamicina foram transplantadas para recipientes plásticos de 300 mL contendo terra vegetal Humus e vermiculita em proporção de 2:1. Os procedimentos de seleção *in vitro* de sementes transgênicas e posterior transferência e cultivo em solo foram mantidas até as linhagens vegetais transgênicas atingirem o estado de homozigose para os genes de interesse (gerações T3 ou T4).

4.6. Cultivo e Inoculação das Versões Recombinantes de p28_35S_Gateway em *Eucalyptus globulus*

Sementes de *E. globulus* Labill. foram gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Luís Mayer Weber (Klabin S.A., Telêmaco Borba, PR). Sementes individuais de *E. globulus* foram plantadas em copos plásticos de 300 mL contendo terra vegetal Humus e vermiculita em proporção 2:1. Aproximadamente, 50 plantas foram mantidas em crescimento (60 dias) na câmara de cultura de plantas sob 16 h luz e a 22 °C para os ensaios de infiltração com as versões recombinantes de p28_35S_Gateway. Caules de 12 plantas de *E. globulus* foram inoculadas com a combinação de p1470 (100 µL de solução contendo 1 µg) e p28_35S_Gateway-*gfp* (100 µL de solução contendo 1 µg; GOVER *et al.*, 2014; MALABARBA *et al.*, 2018). Os procedimentos de preparação de plasmídeos e infiltração com o uso de seringa hipodérmica e agulha foram realizados essencialmente conforme descrito por MALABARBA *et al.* (2018). Após 5 dias, as plantas tratadas foram analisadas em microscópio estereoscópico de fluorescência Leica M165 FC (Prof. Dr. Jorge E.A. Mariath, Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de Biociências, UFRGS) e as fotografias

foram realizadas com o uso do *software* LAS V4.5. Os parâmetros utilizados em cada uma das imagens estão identificados na legenda da Figura 20. Um grupo de plantas de mesma idade e não inoculadas com os plasmídeos foi utilizado como controle negativo do experimento.

4.7. Extração de DNA de *A. thaliana*

As extrações de DNA de folhas de *A. thaliana* foram realizadas utilizando-se 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 65 mA conforme citado em 4.3.1 para confirmação da quantidade e integridade do DNA.

4.8. Confirmação da Presença dos Genes P_{COR15B} -*DaIRIP1-T_{nos}* e P_{Ppbc1} -*AnAFP-T_{nos}* e *GUS* em *A. thaliana*

As PCRs para a confirmação da integração dos genes P_{COR15B} -*DaIRIP1-T_{nos}* e P_{Ppbc1} -*AnAFP-T_{nos}* no genoma de plantas de *A. thaliana* foram realizadas utilizando-se termociclador LGC (XP Cyler). O programa da reação está representado na **Tabela 6**. Os componentes e quantidades da PCR utilizados foram: água ultrapura (36 μL); 5x *Green GoTaq Flexi Buffer* (5 μL ; Promega); 50 mM de MgCl_2 (2 μL); 5 mM de dNTP's (2 μL); 10 mM de *primer* M13 (-21) *Forward* (2 μL); 10 mM *primer* M13 *Reverse* (2 μL); 5 U/ μL de *GoTaq Start DNA Polymerase* (0,5 μL ; Promega); 50 ng/ μL de DNA extraído de amostras de folhas (0,5 μL); 20 ng/ μL de DNA plasmidial. Foram aplicados 5 μL dos *amplicons* resultantes em gel de agarose a 0,8% e corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h

Tabela 6. Programa do termociclador para as PCRs de confirmação da presença dos genes P_{COR15B} -*DaIRIP1-T_{nos}* e P_{Ppbc1} -*AnAFP-T_{nos}* no genoma de plantas de *A. thaliana*

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min	1
Desnaturação	95	30 s	30
Anelamento	55	1 min	30
Extensão	72	1 min	30
Extensão final	72	15 min	1

a 65 mA conforme citado em no Item 4.3.1.

A confirmação do estado de transgenia de plantas transformadas com o plasmídeo controle (pCAMBIA2301) foi realizada por ensaio histoquímico da enzima β -glicoronidase (GUS). Plântulas de *A. thaliana* com fenótipos de resistência frente à canamicina foram imersas em uma solução contendo o reagente 5-bromo-4-cloro-3-indol glicuronídeo (X-GLUC). Os materiais vegetais permaneceram incubados por 2 h e, posteriormente, a solução foi retirada. Etanol a 70% foi adicionado aos materiais para a manutenção da hidratação e conservação dos mesmos (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998).

4.9. Análises Fenotípicas de Plantas Transgênicas de *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* contendo duas ou quatro semanas de vida foram analisadas fenotipicamente. O comprimento de raízes bem como as regiões vegetativas como folhas, caules e siliquas foram analisadas visualmente. Além disso, o conteúdo de sementes nas siliquas foi observado em microscópio estereoscópico de fluorescência Leica M165 FC e as fotografias foram realizadas com o uso do *software* LAS V4.5. Os parâmetros utilizados em cada uma das imagens estão identificados na legenda da Figura 17D.

4.10. Ensaios de Tolerância ao Congelamento

Os ensaios de tolerância ao congelamento foram realizados como descrito por DING *et al.* (2015) com algumas modificações. Plântulas de *A. thaliana* foram cultivadas em placas de Petri contendo meio MS acrescido de 0,6% de ágar por 14 dias a 22 °C. Posteriormente, as plantas foram transplantadas para recipientes plásticos de 200 mL contendo terra vegetal (Humus) e vermiculita seguindo a proporção de 2:1 ou mantidas *in vitro*. Os ensaios em solo e *in vitro* foram precedidos pelo processo de aclimação ao frio no qual as plântulas foram mantidas a 4 °C durante 4 h. As plântulas aclimatadas ao frio foram incubadas imediatamente a -1 °C durante 1 h e posteriormente a temperatura foi reduzida em 1,5 °C/h até o alcance da temperatura de -6 °C ou -8 °C. Por fim, as plantas foram incubadas a 4 °C *o/n* e, finalmente, transferidas para as condições normais de crescimento e desenvolvimento. Ambos os processos de aclimação e os ensaios de tolerância ao congelamento foram realizados em condições de ausência de luz. Todos os tratamentos sob baixas temperaturas foram realizados

em *freezer* vertical Electrolux F21 regulado pelo controlador de temperatura Full Galge MT512E 2HP.

5. RESULTADOS

5.1. Definição das Sequências Gênicas e Projeção dos Genes Sintéticos

Com a finalidade de projetar genes sintéticos potencialmente capazes de conferir tolerância ao congelamento, as sequências promotoras e codificadoras de proteínas foram analisadas de acordo com dados de trabalhos publicados recentemente na literatura científica. As sequências gênicas mais promissoras, de acordo com os critérios estabelecidos no Ítem 4.1, foram agrupadas nas **Tabelas 7 e 8**. Dentre estas sequências, os promotores derivados dos genes codificadores da endoquitinase de *Prunus persica* (*Ppbec1*, do inglês, *Prunus persica* *L. batch endochitinase 1*; TITTARELLI *et al.*, 2009) e da proteína regulada pelo frio de *A. thaliana* (COR15B, do inglês, cold-regulated protein 15; LI *et al.*, 2013) foram escolhidos para a composição dos genes de interesse, devido às acentuadas induções da expressão gênica visualizadas por meio de genes repórteres em condições de baixas temperaturas em diferentes tecidos e sistemas vegetais em comparação com os demais promotores analisados. Além disto, as sequências gênicas codificadoras da proteína que confere a inibição da recristalização de cristais de gelo de *Deschampsia antarctica* (*DaIRIP1*, do inglês, *Deschampsia antarctica ice recrystallization inhibition protein 1*; JOHN *et al.*, 2009; CHEW *et al.*, 2012) e da proteína anticongelante derivada de *Ammopiptanthus nanus* (*AnAFP*, do inglês, *Ammopiptanthus nanus antifreeze protein*), foram elegidos para a composição dos genes de interesse. Genes que codificam AFPs estão diretamente relacionadas com a tolerância ao congelamento em espécies extremófilas. Sendo assim, a utilização destes genes de origem vegetal para conferir tolerância em plantas sensíveis às geadas é uma alternativa promissora devido às funções biológicas destas proteínas em minimizar os danos causados pelos cristais de gelo nos tecidos vegetais.

Tabela 7. Sequências promotoras analisadas neste trabalho

Gene	Organismo	Padrão de expressão gênica	Referencia	Código de acesso GenBank
<i>GR-RBP4</i> (Glycine-rich RNA binding protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Expressão do gene repórter <i>gusA</i> sob regulação do promotor <i>GR-RBP4</i> foi visualizada em diferentes tecidos de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> , incluindo flores, botões florais, pedicelos, folhas e siliquas em condições normais de crescimento. Entretanto, observou-se uma indução da expressão do gene <i>GR-RBP4</i> em plantas de <i>A. thaliana</i> WT sob diversos estresses abióticos, como por exemplo, baixas temperaturas.	Kwak <i>et al.</i> , 2005	NC_003074.8
<i>OsDREB1B</i> (Dehydration-responsive element-binding)	<i>Oryza sativa</i>	Expressão do gene <i>OsDREB1B</i> foi induzida sob condições de baixas temperaturas em plantas de <i>O. sativa</i> WT. Além disto, a expressão do gene repórter <i>gusA</i> sob regulação do promotor <i>OsDREB1B</i> foi induzida em folhas e raízes em condições de baixas temperaturas.	Gutha <i>et al.</i> , 2008	EF556551.1
<i>TaAIDFa</i> (Dehydration responsive element-binding factors)	<i>Triticum aestivum L.</i>	Expressão do gene repórter <i>gusA</i> sob regulação do promotor <i>TaAIDFa</i> foi induzida em calos embriogênicos de trigo em condições de baixas temperaturas.	Xu <i>et al.</i> , 2008	_____
<i>Ppbec1</i> (<i>Prunus persica L</i> batch endochitinase 1)	<i>Prunus persica L batch.</i>	Frutos de pêssego foram capazes de expressar o gene repórter <i>gusA</i> sob controle do promotor do gene <i>Ppbec1</i> apenas em condições de baixas temperaturas. Além disto, a expressão do gene repórter <i>gusA</i> em plântulas transgênicas de <i>A. thaliana</i> foi induzida em caules e folhas.	Tittarelli <i>et al.</i> , 2009	_____
<i>pxero2</i> (Dehydrin family protein)	<i>Prunus persica var</i>	Frutos de pêssego foram capazes de expressar o gene repórter <i>gusA</i> sob controle do promotor do gene <i>pxero2</i> apenas em condições de baixas temperatura. Além disto, a expressão do gene repórter <i>gusA</i> em plântulas transgênicas de <i>A. thaliana</i> foi induzida em caules, folhas e raízes.	Tittarelli <i>et al.</i> , 2009	_____
<i>COR15B</i> (Cold-regulated protein 15B)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Expressão do gene repórter <i>gusA</i> sob controle do promotor <i>COR15B</i> foi induzida em folhas, caules, raízes e tubérculos em condições de baixas temperaturas em plantas de batata transgênicas, embora a expressão do gene repórter tenham sido detectada nos mesmos tecidos em condições normais de temperatura e crescimento. Além disto, amostras tissulares totais de plantas transgênicas de tabaco demonstram uma indução da expressão do gene <i>gusA</i> em condições de baixas temperaturas. Entretanto, caules e folhas demonstraram significativa expressão do gene repórter em condições normais de temperatura e crescimento.	Li <i>et al.</i> , 2013	NC_003071.7

Tabela 8. Sequências codificadoras de proteínas analisadas neste trabalho

Gene	Organismo	Função	Referencia	Código de acesso GenBank
<i>MpAFP14</i> (<i>Microdera punctipennis</i> antifreeze protein 14)	<i>Microdera punctipennis</i> <i>dzungarica</i>	Diminuição da temperatura de congelamento da água e impedimento dos processos de recristalização e crescimento dos cristais de gelo nos tecidos vegetais	Wang <i>et al.</i> , 2008	AY821792.1
<i>Cn-AFP</i> (<i>Chaetoceros neogracile</i> antifreeze protein)	<i>Chaetoceros neogracile</i>	Diminuição da temperatura de congelamento da água e impedimento dos processos de recristalização e crescimento dos cristais de gelo nos tecidos vegetais	Gwak <i>et al.</i> , 2010	FJ595233.1
<i>COR25</i> (<i>Cold-regulated protein 25</i>)	<i>Brassica napus</i>	Interação com membranas celulares permitindo a estabilização das mesmas durante o estresse causado por temperaturas congelantes	Chen <i>et al.</i> , 2011	HM187577.1
<i>DalRIP1</i> (<i>Deschampsia antarctica</i> ice recrystallization inhibition protein 1)	<i>Triticum aestivum</i> L.	Diminuição da temperatura de congelamento da água e impedimento dos processos de recristalização e crescimento dos cristais de gelo nos tecidos vegetais	Chew <i>et al.</i> , 2012	FJ663038.1
<i>TaDREB3</i> (<i>Dehydration-responsive element-binding 3</i>)	<i>Triticum aestivum</i> L.	Regulação da expressão de genes em resposta a seca, salinidade e frio por meio do reconhecimento e ligação aos elementos cis-atuantes de DNA DRE	Kovalchuk <i>et al.</i> , 2013	AY781349.1
<i>PR10</i> (<i>Pathogen-related protein 10</i>)	<i>Pinus monticola</i>	Não conhecida	Liu <i>et al.</i> , 2013	AY064202.1
<i>AnAFP</i> (<i>Ammopiptanthus nanus</i> antifreeze protein)	<i>Ammopiptanthus nanus</i>	Diminuição da temperatura de congelamento da água e impedimento dos processos de recristalização e crescimento dos cristais de gelo nos tecidos vegetais	Deng <i>et al.</i> , 2014	GQ200581.1

As sequências gênicas promotoras e codificadoras de proteínas, em conjunto com o terminador *nos* de *A tumefaciens*, foram agrupadas em dois cassetes gênicos nomeados de P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} (**Figura 10**). Como citado no Item 4.1, sítios de reconhecimento e hidrólise das enzimas de restrição NcoI e BamHI foram adicionados nas extremidades 5' e 3' das sequências codificadoras de proteínas, respectivamente. Além disso, embora não indicado na Figura abaixo, os sítios endógenos de reconhecimento e hidrólise das enzimas de restrição NcoI e BamHI foram removidos dos genes sintéticos por meio da alteração da última base do sítio de restrição, para permitir a correta identificação, purificação e clonagem dos fragmentos com o uso das citadas endonucleases.

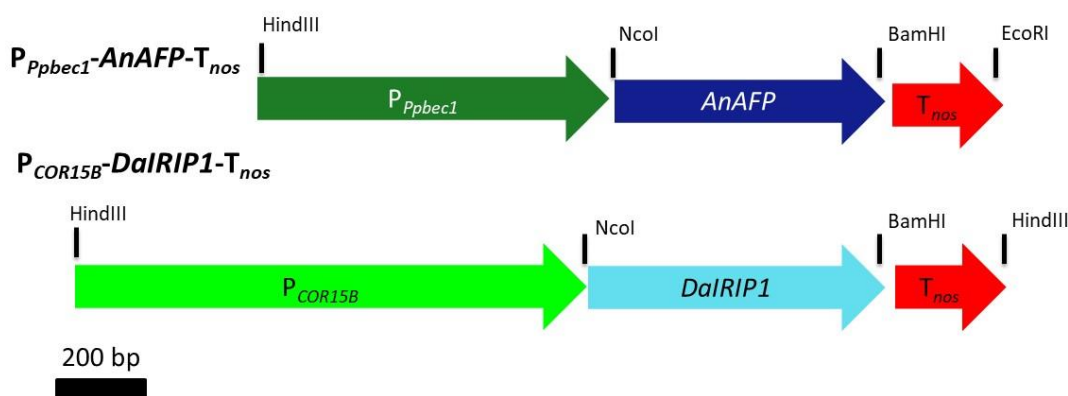


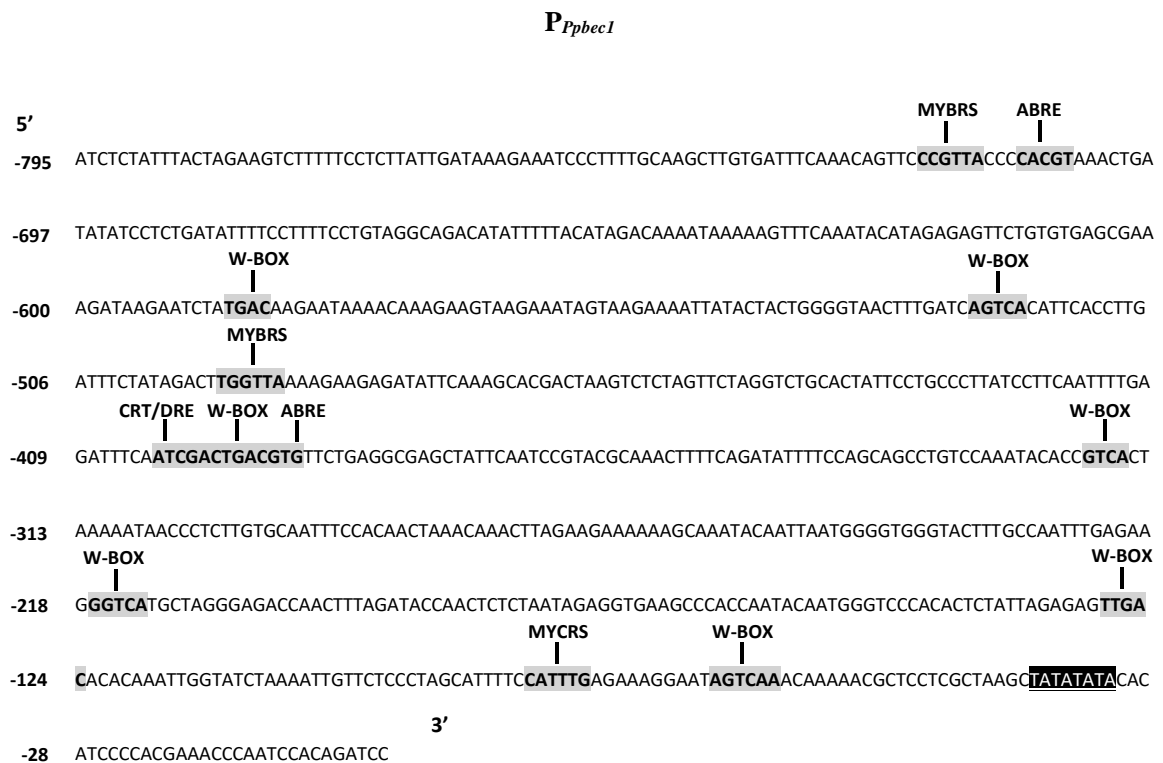
Figura 10: Projeção dos genes sintéticos P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} e P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} . Sítios de reconhecimento e hidrólise das enzimas de restrição NcoI e BamHI inseridos a montante do códon de início e a jusante do códon de término de tradução estão indicados na figura. Além disso, os sítios de reconhecimento e hidrólise das enzimas HindIII e EcoRI utilizados nas etapas de clonagem molecular estão representados nas regiões 5' e 3'.

5.2. Análises *in Silico* das Sequências Promotoras

As análises e buscas por elementos *cis*-atuantes de DNA nas sequências promotoras de *Ppbec1* e *COR15B* foram realizadas por meio da plataforma *online* SOGO, como descrito no Item 4.2. Por meio das análises *in silico*, diversos elementos regulatórios responsivos aos estresses abióticos foram identificados (**Figura 11**) como, por exemplo, o elemento responsivo ao ácido abscísico (ABRE, do inglês, *abscisic acid response element*); a sequência de reconhecimento da proteína MYB (MYBRS, do inglês, *MYB recognition sequence*); a sequência de reconhecimento da proteína MYC (MYBRS, do inglês, *MYC*

recognition sequence); a sequência repetida em citosina/elemento responsivo à desidratação (CRT/DRE, do inglês, *C-repeat/dehydration responsive element*); o elemento responsivo à hiposmolaridade (PRE, do inglês, *Pro- or hypoosmolarity-responsive element*); e a região de reconhecimento dos fatores de transcrição WRKY (W-BOX, do inglês, *WRKY-BOX*). Sendo assim, a presença de elementos *cis*-atuantes de DNA responsivos aos estresses abióticos em conjunto com dados publicados na literatura (TITTARELLI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2013), sugerem que os promotores de *COR15B* e *Ppbec1* são induzíveis pelo frio. Além disto, sequências de DNA pólen-específicas foram identificadas em *P_{COR15B}* como, por exemplo, a região POLLEN1LELAT52 (do inglês, *pollen 1 Lycopersicon esculentum LAT52 gene*) derivada do promotor do gene *LAT52* de *Lycopersicon esculentum* e o motivo GTGA (*GTGA-motif*; **Figura 11B**).

A)



solicitado. Foi possível visualizar, de acordo com a **Figura 12**, padrões de fragmentos de DNA hidrolisados de 2,9 e 1,4 kb semelhantes aos padrões de bandas teóricas esperados referentes a pUC57-P_{Ppbc1}-AnAFP-T_{nos} e 4,9 kb referente à pUC57-P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}. A confirmação da integridade dos genes foi realizada por sequenciamento de DNA (dados não mostrados) com o uso de *primers* específicos (**Tabela 3**).

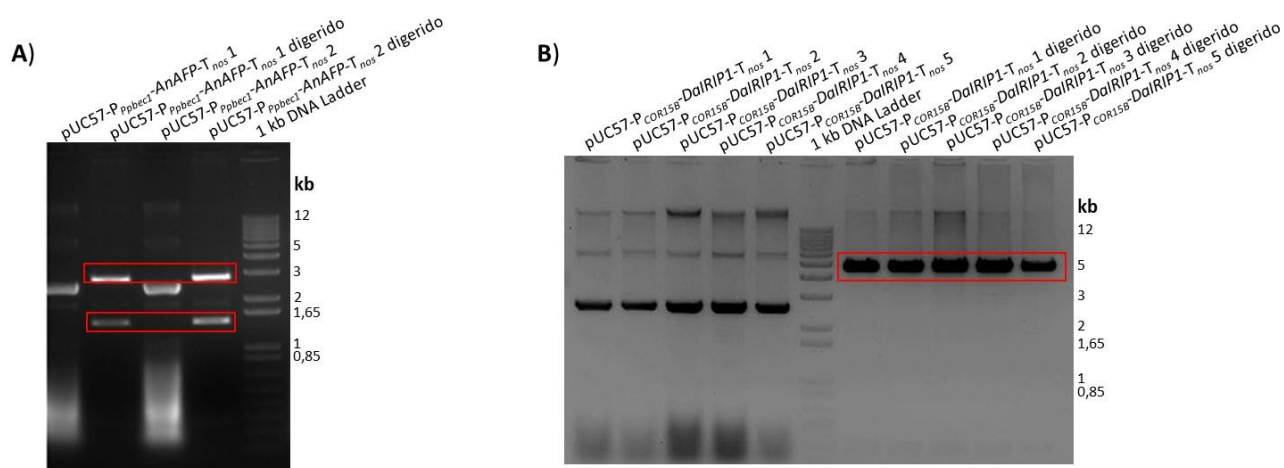


Figura 12. Imagens resultantes das eletroforeses em gel de agarose dos plasmídeos pUC57 contendo os genes de interesse. Amostras de pUC57-P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos} (A) e P_{Ppbc1}-AnAFP-T_{nos} (B) hidrolisadas e não hidrolisadas com a enzima de restrição BamHI. Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados: 2,9 e 1,4 kb (A); 4,9 kb (B). O marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (1 kb DNA Ladder, Ludwig Biotec) está indicado nas imagens.

5.3. Isolamento dos Genes de Interesse do Vetor Plasmidial pUC57

Os cassetes gênicos P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos} e P_{Ppbc1}-AnAFP-T_{nos} foram isolados do plasmídeo pUC57 por meio de reações de hidrólise com o uso das enzimas de restrição HindIII e a combinação entre HindIII e EcoRI, respectivamente. Os produtos das reações de hidrólise foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos de DNA referentes aos genes de interesse foram excisados do gel e, posteriormente, purificados do mesmo. Como indicado na **Figura 13A**, foi possível visualizar fragmentos de DNA purificados com os exatos tamanhos dos genes sintéticos (2,1 e 1,6 kb). Paralelamente, o plasmídeo binário pCAMBIA2300 foi hidrolisado com as mesmas enzimas de restrição citadas acima e submetido aos tratamentos com a enzima fosfatase alcalina para impedir a religação de suas extremidades.

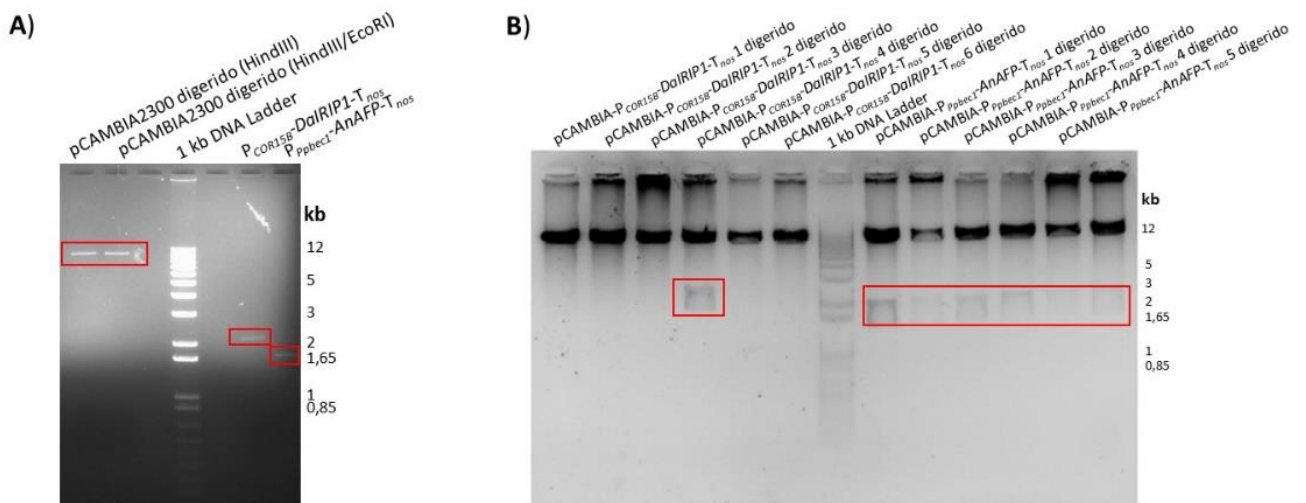


Figura 13. Imagens resultantes das eletroforeses em gel de agarose dos genes P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} e P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} e das versões recombinantes e não recombinantes de pCAMBIA2300 hidrolisados com as enzimas de restrição **HindIII** e **EcoRI**. (A): Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados (pCAMBIA2300 hidrolisado com a enzima **HindIII**: 87 kb; pCAMBIA2300 hidrolisado com as enzimas **HindIII** e **EcoRI**: 8,7 bp; P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} : 2,1 kb; P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} : 1,6 kb; (B): Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados de 2,1 e 1,6 kb referentes às versões pCAMBIA2300- P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} e pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} hidrolisados com as enzimas **HindIII** e **EcoRI**. O marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (*1 kb DNA Ladder*, Ludwig Biotec) está indicado nas imagens.

Os genes sintéticos foram ligados ao plasmídeo binário pCAMBIA2300 linearizado e defosforilado com o uso da enzima T4 DNA-ligase (Ítem 4.3.3). Os produtos das reações de ligação foram utilizados para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli* OmniMax2. Seis colônias para cada linhagem foram obtidas e as mesmas foram submetidas ao processo de preparação plasmidial e hidrólise com as enzimas de restrição **HindIII** ou a combinação entre **HindIII** e **EcoRI**. Conforme ilustrado na **Figura 13B** por meio de uma eletroforese em gel de agarose, foi possível visualizar os fragmentos de interesse relativos aos genes P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} (2,1 kb) na amostra pCAMBIA2300- P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} 4 e também P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} nas amostras pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} 1-6. As amostras pCAMBIA2300- P_{COR15B} - $DaIRIP1$ - T_{nos} 4 e pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} - $AnAFP$ - T_{nos} 1 foram sequenciadas para a confirmação da natureza recombinante das amostras (dados não mostrados).

5.5. Isolamento das Sequências Codificadoras das Proteínas DaIRIP1 e AnAFP de pUC57

Com vistas a expressar as regiões codificadoras das potenciais proteínas anticongelantes via vetor plasmidial p28_35S_Gateway em plantas jovens de *E. globulus*, as sequências *DaIRIP1* e *AnAFP* foram isoladas dos respectivos plasmídeos pUC57 por meio de PCR com os *primers* específicos listados na **Tabela 2** (Item 4.3.1). Como visualizado na **Figura 14**, por meio de eletroforese em gel de agarose, ambas as sequências *DaIRIP1* (669 bp) e *AnAFP* (612 bp) foram amplificadas com sucesso.

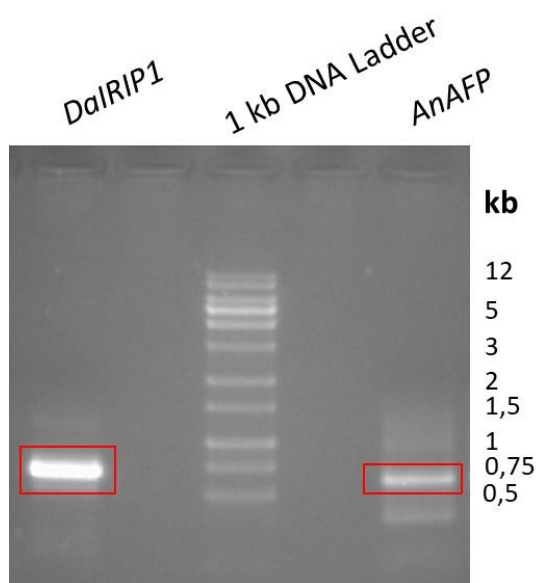
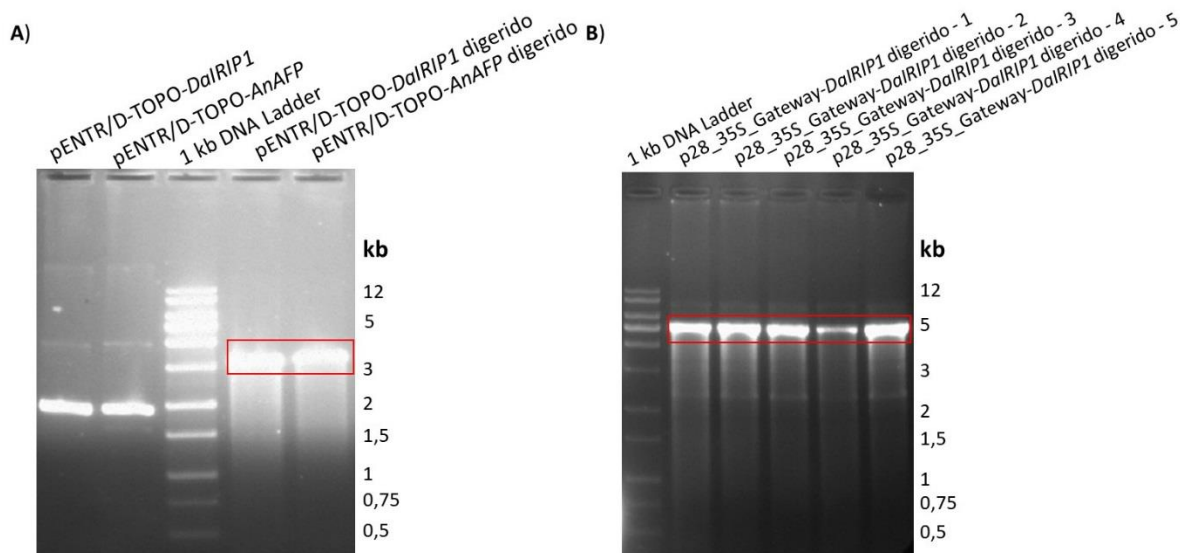


Figura 14. Imagem resultante da eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR referentes às sequências codificadoras das proteínas *DaIRIP1* e *AnAFP*. Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados de 669 e 612 bp de *DaIRIP1* e *AnAFP*, respectivamente. O marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (*1 kb DNA Ladder*, Ludwig Biotec) está indicado nas imagens.

5.6. Inserção das Sequências Codificadoras das Proteínas DaIRIP1, AnAFP e GFP no Plasmídeo p28_35S

Os produtos de *DaIRIP1* e *AnAFP* amplificados pelas PCRs foram ligados ao vetor de entrada plasmidial pENTR/D-TOPO via enzima topoisomerase, como descrito no Item 4.3.5. As colônias resultantes da etapa de transformação genética de *E. coli* OminiMax2 foram

submetidas à preparação plasmidial e posterior hidrólise com a enzima de restrição NcoI para averiguar a natureza recombinante dos plasmídeos. Foi possível visualizar, de acordo com a **Figura 15A**, fragmentos com os tamanhos aproximados ao esperado (pENTR/D-TOPO-*DaIRIP1*: 3.249 bp; pENTR/D-TOPO-*AnAFP*: 3.192 bp), sugerindo a perfeita ligação das sequências de interesse em pENTR/D-TOPO. A seguir, por meio de uma etapa de recombinação via enzima LR clonase (Item 4.3.5), os genes *DaIRIP1* e *AnAFP* foram inseridos no vetor plasmidial p28_35S_Gateway. Em paralelo, com vistas a testar a eficiência do método de inoculação de plasmídeos “vegetais”, a sequência codificadora de GFP foi também inserido no vetor plasmidial p28_35S_Gateway. De acordo com a **Figura 15 (B, C e D)** e por meio de reações de hidrólise com enzimas de restrição seguidas de eletroforese em gel de agarose, foi possível visualizar os fragmentos esperados de 5,3 kb para p28_35_Gateway-*DaIRIP1*, 5,2 kb para p28_35_Gateway-*AnAFP* e 3 e 2,4 kb para p28_35S_Gateway-*gfp*. Sendo assim, foi possível confirmar o sucesso das reações de ligação das sequências *DaIRIP1*, *AnAFP* e *gfp* no plasmídeo p28_35S_Gateway.



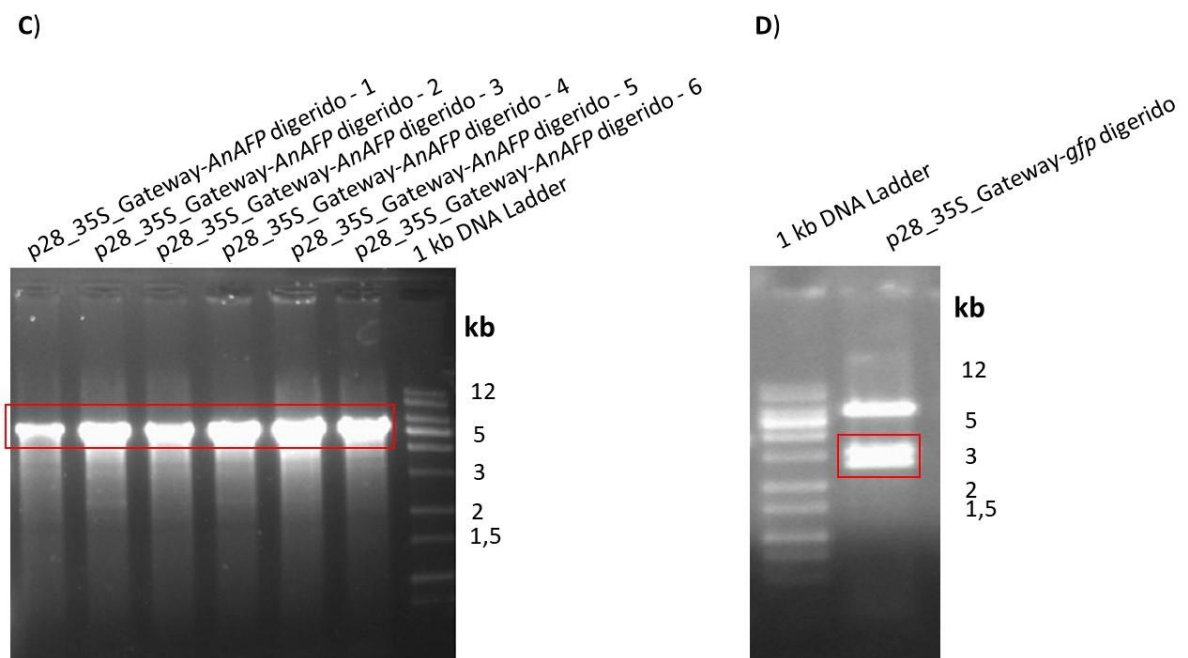


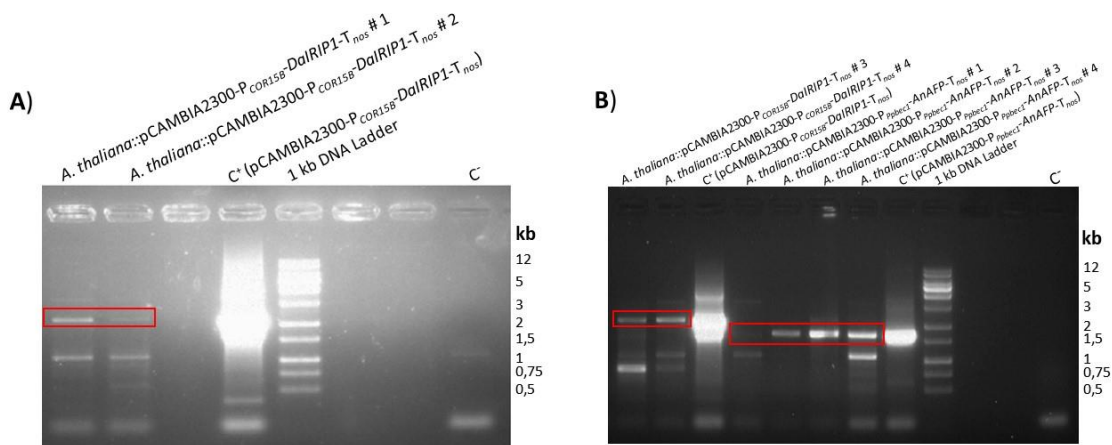
Figura 15. Imagens resultantes das eletroforeses em gel de agarose dos plasmídeos pENTR/D-TOPO-*DaIRIP1*, pENTR/D-TOPO-*AnAFP*, p28_35S_Gateway-*DaIRIP1* e p28_35S_Gateway-*AnAFP* hidrolisados com enzimas de restrição. Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados (A: 3.249 e 3.192 bp em relação aos plasmídeos pENTR/D-TOPO-*DaIRIP1*, pENTR/D-TOPO-*AnAFP*, respectivamente; B: 5.297 bp em relação ao p28_35S_Gateway-*DaIRIP1*; C: 5.240 bp em relação ao p28_35S_Gateway-*AnAFP*). O marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (*1 kb DNA Ladder*, Ludwig Biotec) está indicado nas imagens.

5.7. Transformação Genética de Células de *A. tumefaciens* EHA105 com pCAMBIA2300 Contendo os Genes P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e P_{Ppbc1} -*AnAFP*- T_{nos}

Células termocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas geneticamente com as versões recombinantes de pCAMBIA2300 contendo os genes sintéticos (Item 4.4) e diversas colônias oriundas do processo de transformação foram obtidas. Além destas, foram obtidas também colônias de *A. tumefaciens* EHA105::pCAMBIA2301 para emprego como controle positivo da etapa de transformação genética de plantas. Uma única colônia de cada linhagem transformada foi selecionada para as posteriores etapas de transformação genética de plantas (resultados não apresentados).

5.8. Transformação Genética de *A. thaliana* com Linhagens de *A. tumefaciens* EHA105

Plantas de *A. thaliana* foram transformadas com versões de *A. tumefaciens* EHA105 contendo os plasmídeos recombinantes pCAMBIA2300- P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} , pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} ou pCAMBIA2301 (controle). As sementes de *A. thaliana* coletadas foram descontaminadas e selecionadas por meio do antibiótico de seleção canamicina (Item 4.6). Dentre as plantas resistentes à canamicina e sobreviventes ao processo de transferência do meio de cultura *in vitro* para o solo, o estado de transgenia foi confirmado para quatro diferentes linhagens contendo cada um dos genes P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} . Conforme pode ser visto na **Figura 16 (A e B)** por meio de eletroforeses em gel de agarose, as amostras de DNA derivadas das plantas e submetidas à PCR apresentaram os fragmentos esperados (2,1: P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} ; 1,6 kb: P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos}). Três das quatro linhagens de cada um dos genes de interesse em homozigose foram avaliadas no restante do estudo. O estado de transgenia para plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2301 (controle) foi confirmado por ensaio histoquímico de GUS (**Figura 16C**).



C)

A. thaliana::pCAMBIA2301



Figura 16. Imagens resultantes das eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR de DNA derivado de plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2300- P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e *A. thaliana*::pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} (A e B) e do ensaio histoquímico da enzima β -glicoronidase (GUS) em plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2301 (C). Os retângulos em vermelho referem-se aos fragmentos esperados de 2,1 e 1,6 kb em relação às plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2300- P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e *A. thaliana*::pCAMBIA2300- P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} , respectivamente. O marcador de tamanhos de fragmentos de DNA (*1 kb DNA Ladder*, Ludwig Biotec) está indicado nas imagens.

5.9. Análises Fenotípicas de Plantas Transgênicas de *A. thaliana*

Plantas transgênicas de *A. thaliana* foram avaliadas fenotipicamente em condições normais de crescimento para averiguar se os genes sintéticos poderiam promover algum tipo de alteração no desenvolvimento das mesmas. Nenhuma das três linhagens transgênicas e homocigotas contendo o gene P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} apresentou alterações fenotípicas como tempo de florescimento ou redução de tamanho em relação às plantas selvagens (WT; dados não mostrados). Em contrapartida, todas as três linhagens transgênicas e homocigotas contendo o gene P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} apresentaram comprometimento nos seus desenvolvimentos no estágio adulto (**Figura 17**), embora nenhum efeito do gene tenha sido detectado em plantas heterocigotas. Dentre as alterações observadas, destacaram-se fragilidade e ramificação das partes aéreas (**Figura 17A**), deficiência na formação de siliques (**17C**), além da ausência de sementes (**17D**). Curiosamente, no estágio juvenil (plântulas com duas semanas de vida), não houve diferenças entre as plantas transgênicas contendo o gene P_{COR15B} -*DaIRIP1*- T_{nos} e WT (**17B**).

A)



B)



C)



D)

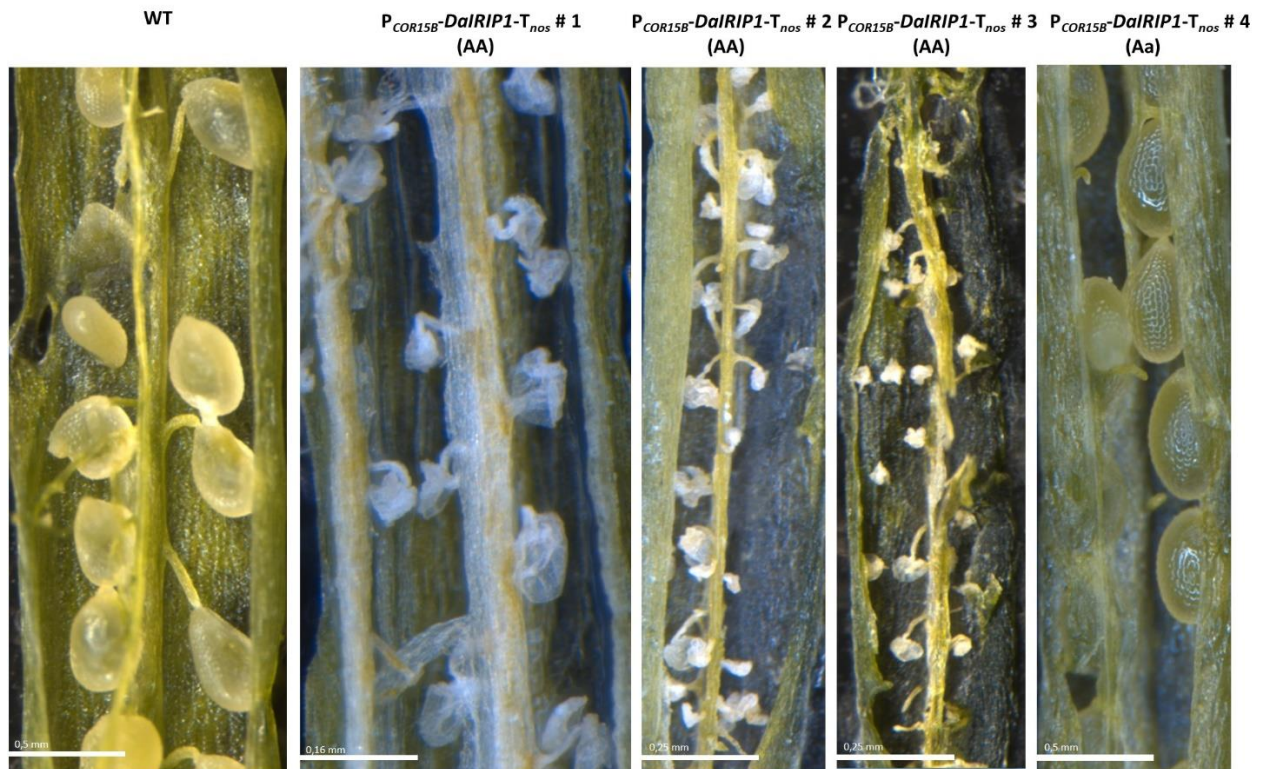


Figura 17. Fenótipos de plantas de *A. thaliana* WT e contendo o gene $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ mantidas a 22 °C. Por meio das imagens, é possível comparar plantas transformadas e não transformadas em relação à ramificação das partes aéreas (A), estágio juvenil (B), tamanho das síliques (C) e produção de sementes (D). Nas imagens de microscopia (D), o aumento em número de vezes utilizado para cada uma das imagens foi: WT: 3,26 X; $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ # 1: 10,10 X; $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ # 2: 5,06 X; $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ # 3: 5,02 X; $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ # 4: 3,26 X.

5.10. Ensaio de Tolerância ao Congelamento

Plantas de *A. thaliana* WT e contendo o gene sintético $P_{Ppbec1}\text{-}AnAFP\text{-}T_{nos}$ foram submetidas aos ensaios de congelamento *in vitro*. Em razão do comprometimento quase que total da produção de sementes, plantas transgênicas contendo o gene $P_{COR15B}\text{-}DaIRIP1\text{-}T_{nos}$ não foram utilizadas nestes ensaios. Inicialmente, as plântulas de *A. thaliana* utilizadas nos ensaios foram incubadas até a temperatura de -6 °C por 1 h. Como pode ser visualizado na **Figura 18A**, tanto plantas transgênicas quanto plantas WT foram capazes de sobreviver sem quaisquer danos observáveis visualmente ou comprometimento nos seus desenvolvimentos após a realização do experimento. Sendo assim, com a finalidade de averiguar diferenças na tolerância ao congelamento entre plantas WT e transgênicas, novos ensaios foram realizados estabelecendo-se o valor de -8 °C como a temperatura limite dos experimentos *in vitro* e em

solo. Além disto, plântulas de *A. thaliana* transformadas com o plasmídeo controle pCAMBIA2301 foram utilizadas também como um segundo grupo controle nos experimentos realizados.

Entretanto, apesar das incubações das plantas à menor temperatura, não houve diferenças *in vitro* entre plântulas contendo o gene $P_{Ppbec1}\text{-AnAFP-T}_{nos}$ e WT, apesar de que as plântulas transformadas contendo o cassete gênico de pCAMBIA2301 não foram capazes de sobreviver após o experimento (**Figura 18B**).

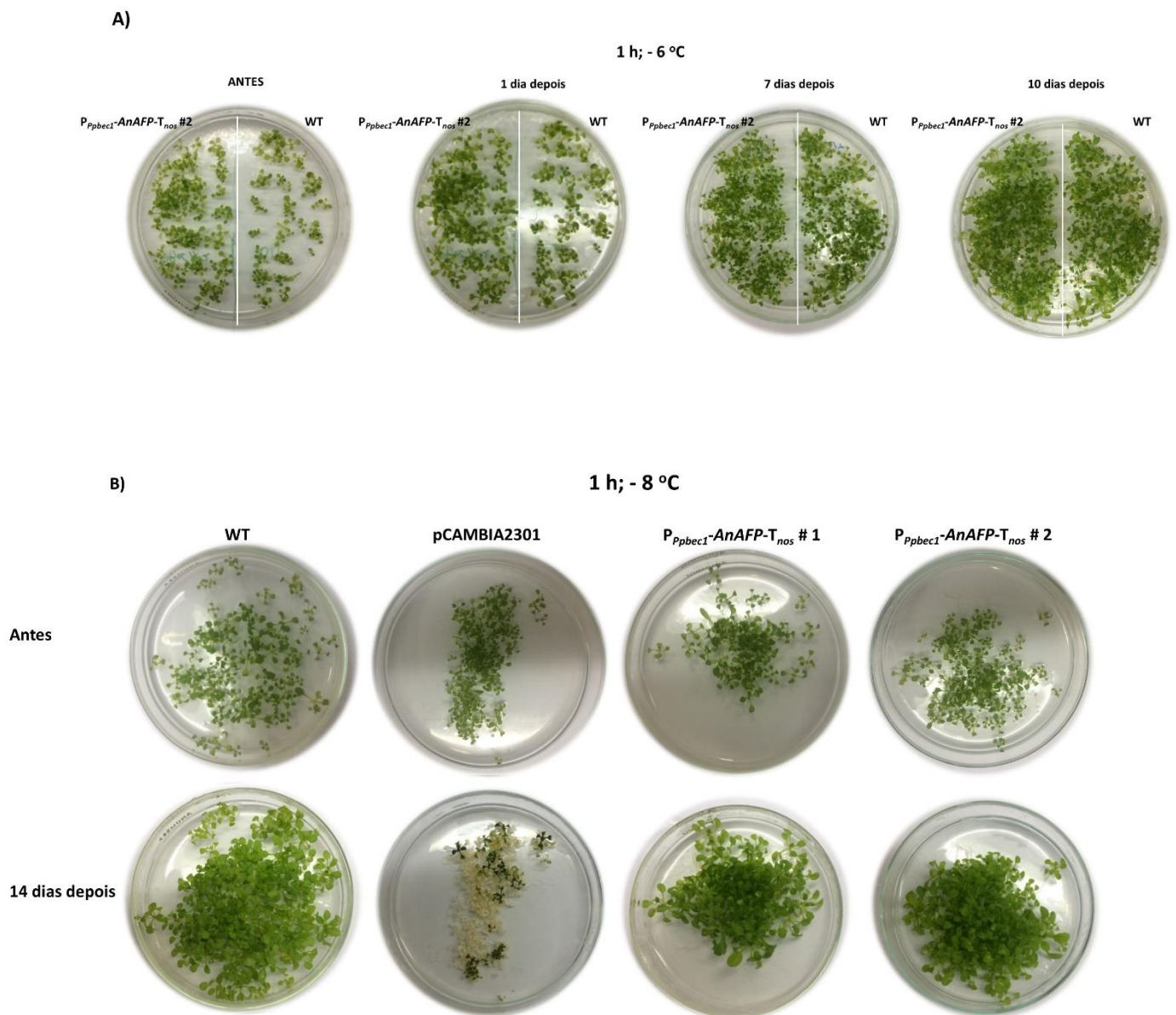


Figura 18: Ensaios de tolerância ao congelamento *in vitro* com plantas de *A. thaliana* controle e contendo o gene P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} . (A): plantas de *A. thaliana* antes e depois das incubações até a temperatura limite de -6 °C por 1 h. (B): plantas de *A. thaliana* antes e depois das incubações até a temperatura limite de -8 °C por 1 h.

Nos experimentos em solo (**Figura 19**), utilizando-se -8 °C como temperatura limite, todas as 15 plantas de *A. thaliana* WT utilizadas neste ensaio morreram. Contrariamente, as linhagens de *A. thaliana*:: P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} #1, #2, e #3 apresentaram taxas de sobrevivência de 6,7%, 27,3% e 40%, respectivamente. Contudo, as plantas-controle *A. thaliana*::pCAMBIA2301 também apresentaram taxa de sobrevivência de 40%.

1 h; - 8 °C

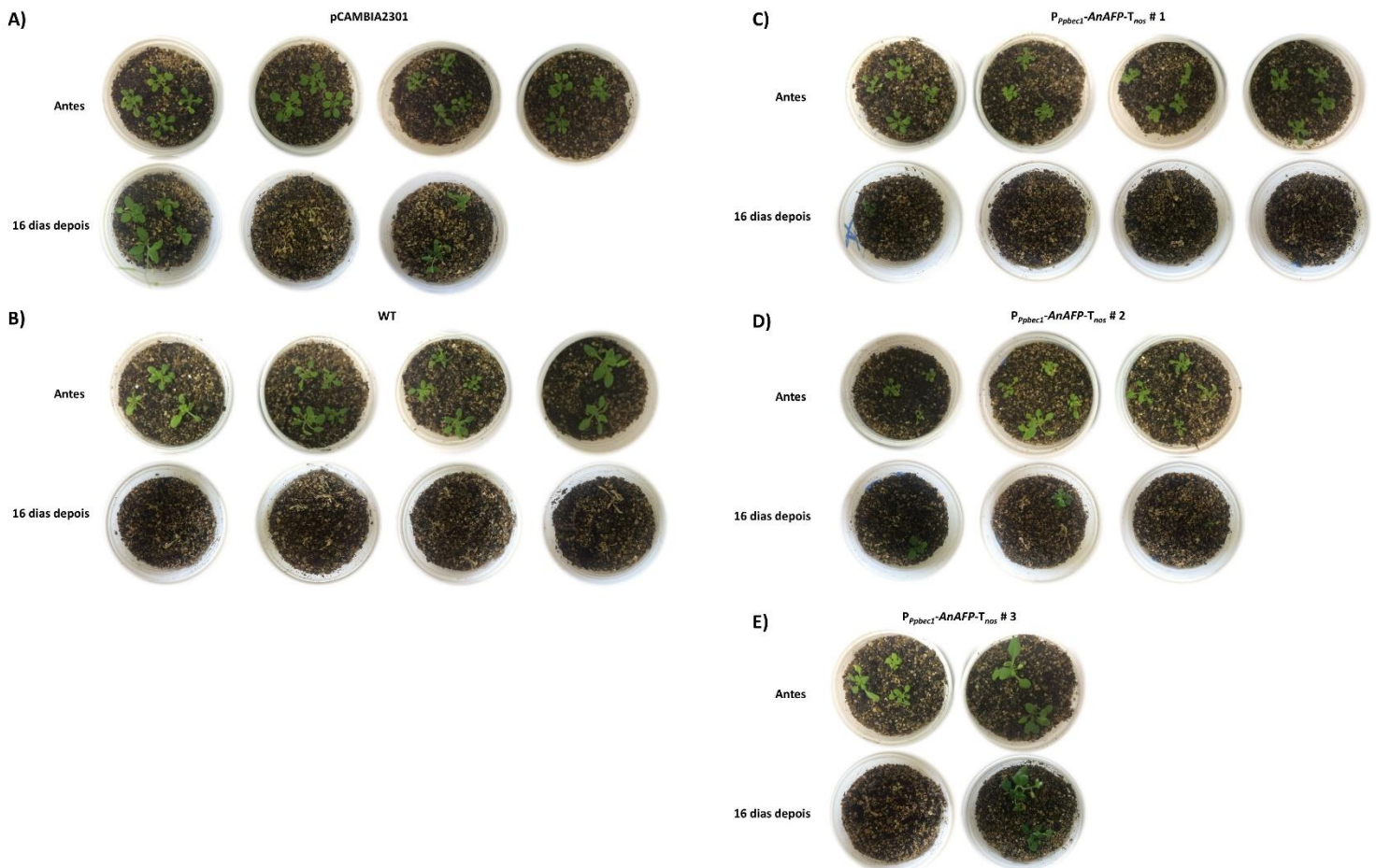


Figura 19: Ensaios de tolerância ao congelamento em solo com plantas de *A. thaliana* controle e contendo o gene P_{Ppbec1} -*AnAFP*- T_{nos} . As imagens foram registradas antes e 16 dias após a incubação até a temperatura limite de -8 °C. (A): Plantas de *A. thaliana* transformadas com o plasmídeo controle

pCAMBIA2301; (B): Plantas de *A. thaliana* WT; (C): Plantas de *A. thaliana*::P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos} #1; (D): Plantas de *A. thaliana*::P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos} #2; (E): Plantas de *A. thaliana*::P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos} #3.

5.11. Avaliação da Expressão de *gfp* em Plantas de *Eucalyptus* Inoculadas com p28_35S_Gateway-*gfp* e p1470

Como descrito no Item 4.6, 12 plantas de *E. globulus* foram inoculadas com p28_35S_Gateway-*gfp* e p1470. Cinco dias após o experimento, plantas tratadas e não inoculadas (controle negativo) foram visualizadas por microscopia de fluorescência. Dentre as plantas analisadas, três apresentaram intensidades de fluorescência mais acentuadas que o grupo controle (Figura 20). Portanto, pode-se inferir que o método de injeção de plasmídeos “vegetais” empregados foi capaz de promover a expressão de genes exógenos em *E. globulus*.

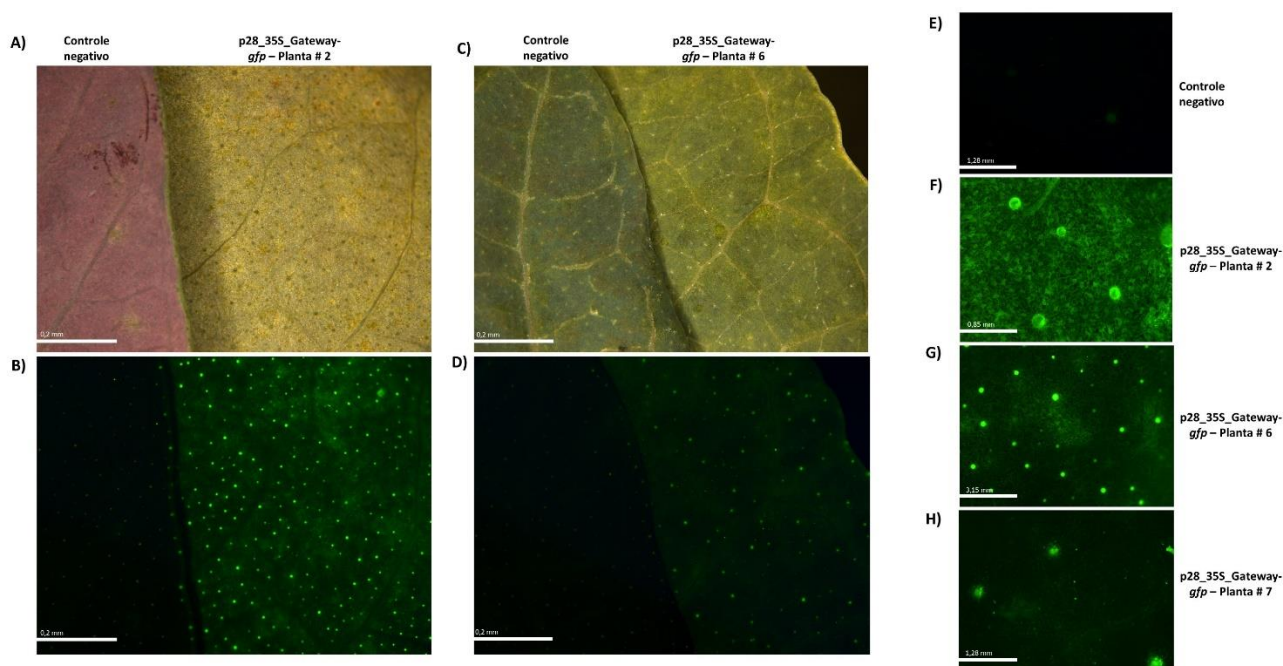


Figura 20: Microscopia de fluorescência de folhas de plantas de *E. globulus* controle e infiltradas com os plasmídeos p28_35S_Gateway-GFP e p1470. As imagens foram registradas 5 dias após o tratamento. (A e C): fotografia em campo claro de folhas de plantas de *E. globulus* inoculadas (plantas 2 e 6) e não inoculadas (controle negativo) com os plasmídeos de interesse. (B e D): fotografia de plantas *E. globulus* inoculadas (plantas 2 e 6) e não inoculadas com os plasmídeos de interesse excitadas com luz azul monocromática. (E): Aproximação da imagem referente às folhas de plantas de *E. globulus* não inoculadas e excitadas com luz azul monocromática. (F-H): Aproximação da imagem referente às folhas de plantas de *E. globulus* inoculadas (plantas 2, 6 e 7) e excitadas com luz azul monocromática. Os parâmetros utilizados (tempo de exposição à luz

azul monocromática e aumento em número de vezes) nas imagens foram: **(A e C)**: 12 ms e 1,25 X; **(B e D)**: 12, 2 s e 1,25 X; **(E)**: 4,8 S e 8,11 X; **(F)**: 4,8 S e 12,1 X; **(G)**: 6,8 S e 3,26 X; **(H)**: 6,15 S e 8,06 X.

6. DISCUSSÃO

Com vistas a promover a tolerância às geadas (congelamento) em plantas de *Eucalyptus*, potenciais genes sintéticos foram projetados neste trabalho. Inicialmente, sequências gênicas hábeis em induzir a transcrição sob baixas temperaturas foram selecionadas de acordo com trabalhos recentes disponíveis na literatura científica. Dados publicados por TITTARELLI *et al.* (2009) demonstram que, por meio de ensaios de expressão transiente, frutos de pêssago foram capazes de expressar o gene repórter *gusA* sob controle do promotor do gene *Ppbec1* apenas após a exposição a 4 °C. Além disto, plântulas transgênicas de *A. thaliana*, contendo o cassete gênico *Ppbec1:gusA* e mantidas a 24 °C apresentaram níveis basais de expressão do gene repórter. Todavia, as mesmas plantas aclimatadas a 4 °C durante uma semana apresentaram um aumento significativo da expressão do gene repórter. De forma análoga, LI *et al.* (2013) demonstraram que plantas transgênicas de batata e tabaco, contendo o promotor do gene *COR15B* fusionado ao gene *gusA*, apresentaram aumento da expressão do gene repórter em folhas, tubérculos, raízes, caules primários e secundários sob condições de 4 °C, embora níveis significativos de expressão gênica a 20 °C também tenham sido detectados.

De acordo com TITTARELLI *et al.* (2009), alguns elementos *cis*-atuantes de DNA responsivos aos estresses abióticos foram encontrados em *Ppbec1* como, por exemplo, ABRE (posição -709 bp), MYBRS (posições -718, -492, e aproximadamente -295 bp) e MYCRS (-82 bp). De acordo com as análises realizadas neste estudo, todos os elementos citados acima foram identificados à exceção do elemento MYBRS na região próxima aos -295 bp. Além disto, análises *in silico* permitiram a identificação de outros elementos não descritos previamente como, por exemplo, ABRE (posição -393 bp), CRT/DRE (posição -401 bp) e W-BOX (posições -586, -521, -396, -318, -216, -127 e -66 bp). Similarmente, LI *et al.* (2013) identificaram os elementos CRT/DRE (posição -272 bp) e ABRE (posições -234 e -150 bp). Por meio das nossas análises, os elementos citados foram identificados, exceto o ABRE na posição -150 bp. Contudo, uma série de outros elementos foram encontrados, destacando-se os responsivos aos estresses abióticos (CRT/DRE: -831 pb; MYBRS: -1125, -680, -296, -288, -250 e -238 bp; MYCRS: -1105, -305 e -149 bp; PRE: -1163 bp; W-BOX: -1075; -1010, -853, -464 e 715 bp) e outros pólen-específicos (POLLEN1LELAT52: -1043, -559, -345, -260, -243, -84, -71 e -52 bp; GTGA-motif: -1074, -918, -867, -852, -793, -605, -152 e -75 bp).

Devido ao fato de que estresses causados por baixas temperaturas e seca compartilham similaridades e diversos aspectos em comum, elementos *cis*-atuantes de DNA responsivos à

seca e regulados pelo fitormônio ABA são comumente encontrados em promotores induzíveis por frio. ABRE e CRT/DRE são reconhecidos pelo fator de ligação responsivo ao ABA (ABF, do inglês, *abscisic acid binding factor*) e pelos fatores de ligação às sequências repetidas em citosina/fatores de ligação aos elementos responsivos à desidratação (CBF/DREB1, do inglês, *C-repeat binding factor/dehydration responsive element binding 1*), respectivamente, e desempenham um papel-chave na ativação da expressão gênica em resposta às baixas temperaturas (SIMPSON *et al.*, 2003; NAKASHIMA *et al.*, 2006; KIDOKORO *et al.*, 2015; PARK *et al.*, 2015). MYBRS e MYCRS são sequências de DNA reconhecidas pelos fatores de transcrição MYB e MYC e ambos fatores são induzíveis por ABA e participam da ativação da expressão de genes em resposta aos estresses abióticos (URAO *et al.*, 1993; ABE *et al.*, 2003; AGARWAL & JHA, 2010). As sequências de DNA denominadas W-BOX são reconhecidas pelos fatores de transcrição denominados WRKY. Em condições normais de crescimento, as proteínas WRKY regulam funções relacionadas ao desenvolvimento vegetal. Contudo, sob condições de estresses bióticos e abióticos, os fatores de transcrição WRKY desempenham papel de destaque na reprogramação da transcrição nas células vegetais (SUN *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; BANERJEE & ROYCHOUDHURY, 2015).

As sequências codificadoras de AnAFP e DaIRIP1 descritas por YU *et al.* (2009) e JOHN *et al.* (2009) e derivadas de *A. nanus* e *D. antarctica*, respectivamente, foram selecionadas para compor os genes sintéticos. 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 CaMV 35S em tabaco tornou as plantas transgênicas tolerantes ao congelamento. Além disto, as plantas não apresentaram quaisquer danos tissulares nas condições de incubação a -3 °C durante 3 h de exposição. Segundo CHEW *et al.* (2012), o gene *DaIRIP1* está envolvido com o processo de aclimação ao frio nas plantas de *D. antarctica*, promovendo atividades anticongelantes diretamente relacionadas com a obtenção da tolerância ao frio e/ou ao congelamento. Extratos proteicos de folhas de plantas transgênicas de *A. thaliana* contendo o gene *DaIRIP4* demonstraram atividade IRI, embora dados a respeito de ganho de tolerância ao congelamento não tenham sido reportados (JOHN *et al.*, 2009). Recentemente, BREDOW *et al.* (2017a) demonstraram que plantas de *A. thaliana* superexpressando genes *IRIPs* da espécie vegetal *Lolium perene* (*LpIRIs*) apresentaram taxas de sobrevivência

significativamente maiores em relação às plantas WT sob -6 e -7 °C. Contudo, nenhum dos estudos mencionados evidenciou o efeito e a obtenção de tolerância ao congelamento em plantas transgênicas expressando o gene *DaIRIP1*.

Neste estudo, quatro linhagens de plantas transgênicas de *A. thaliana* contendo os genes sintéticos de interesse foram geradas. Plantas de *A. thaliana* $P_{Ppbec1-AnAFP-Tnos}$ foram avaliadas quanto à tolerância ao congelamento. Entretanto, nas condições testadas neste estudo, não foi possível visualizar diferenças na tolerância ao congelamento entre plantas transgênicas e WT. Segundo os protocolos disponíveis na literatura científica, plantas de *A. thaliana* WT apresentam um decréscimo significativo nas taxas de sobrevivência entre -6 e -8 °C (HU *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2015 JIANG *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017). Entretanto, em nenhum dos experimentos realizados *in vitro* foi possível estabelecer uma temperatura crítica, capaz de promover um decréscimo significativo nas taxas de sobrevivência das plantas WT. Sendo assim, os ensaios de congelamento *in vitro* deverão ser otimizados. Como uma alternativa a ser testada, plantas aclimatadas por períodos de tempo maiores poderão ser incubadas diretamente a -6, -8 e -10 °C sem o decréscimo gradual da temperatura. Alterações bruscas na temperatura causam danos mais acentuados às plantas e, assim, poderão permitir o estabelecimento de condições limítrofes para a distinção de tolerância, se houver, entre as plantas transgênicas e controle.

Por meio dos ensaios de tolerância ao congelamento em solo, houve diferenças entre as taxas de sobrevivência das linhagens de plantas transgênicas contendo o gene $P_{Ppbec1-AnAFP-Tnos}$ (6,7%, 27,3% e 40% em relação às linhagens de #1, #2 e #3, respectivamente) e WT. Todavia, plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2301, sem quaisquer dos genes sintéticos, também apresentaram taxas de sobrevivência de 40%. Contudo, de maneira geral, as plantas de *A. thaliana*::pCAMBIA2301 utilizadas no experimento demonstravam estágio de desenvolvimento mais avançado em relação às plantas pertencentes aos demais grupos com, por exemplo, tamanhos maiores e maior número de folhas. Sendo assim, este fator pode ter sido relevante para este grupo-controle ter apresentado uma taxa de sobrevivência elevada. Deste modo, para a obtenção da confirmação da capacidade de $P_{Ppbec1-AnAFP-Tnos}$ em conferir tolerância ao congelamento, novos ensaios deverão ser repetidos com os mesmos parâmetros e condições utilizadas anteriormente, exceto pelo maior número de amostras e com todas as plantas rigorosamente no mesmo estágio de desenvolvimento.

Além disto, um fator importante para a averiguação de tolerância ao congelamento em plantas é o período de aclimação realizado antes do experimento. Comumente, as plantas

são aclimatadas entre 1 semana e 10 dias a 4 °C, mantendo-se fotoperíodo de 16 h luz. Entretanto, por não condizer com as condições reais de campo, as plantas foram aclimatadas sob intervalos curtos de 4 h antes dos experimentos. Portanto, como o promotor de *Ppbec1* é induzível ao frio (TITTARELLI *et al.*, 2009), o encurtamento do período de aclimação pode ter sido um fator relevante nos resultados apresentados.

Diferentemente de *P_{Ppbec1}-AnAFP-T_{nos}*, o gene sintético *P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}* promoveu alterações severas no desenvolvimento das plantas como, por exemplo, a redução em aproximadamente 50% do tamanho das siliques e a inibição da produção de sementes, inviabilizando as posteriores análises com estas plantas. De acordo com a **Figura 16D**, a fecundação dos óvulos de plantas homozigotas foi interrompida enquanto plantas heterozigotas não apresentaram qualquer alteração em relação às plantas WT. De acordo com SANDVE *et al.* (2008), os peptídeos da classe IRIP são semelhantes a diversas famílias proteicas, incluindo taumatina, endoquitinase, endo- β -1,3-glicanase e proteínas contendo LRRs na região N-terminal. Dentre as IRIPs contendo LRR, proteínas significativamente similares (55–68%) à DaIRIP1 como, por exemplo, LpIRI1 (código de acesso GenBank: ACG63781.1), LpIRI3 (código de acesso GenBank: ACG63783.1) e LpIRI4 (código de acesso GenBank: ACG63784.1) apresentam altos índices de homologia com a região proteica LRR relativa ao receptor do tipo quinase do hormônio peptídico vegetal fitossulfoquina (PSR, do inglês, *phytosulfokine receptor*).

Por meio de análises de filogenia molecular, acredita-se que os genes *IRIP* surgiram evolutivamente a partir de *PSR* após a divergência entre as espécies de arroz e as gramíneas da família das Poaceas. Sendo assim, ao longo do processo evolutivo, pequenos eventos de duplicação ocorreram na região do códon 5 do gene. As duplicações, inicialmente, promoveram a troca de fase na sequência codificadora do domínio responsável pela atividade de quinase da proteína ancestral e consequente inativação da mesma. Posteriormente, o domínio quinase foi perdido e os recorrentes eventos de duplicação promoveram o surgimento do motivo IRIP (SANDVE *et al.*, 2010). Assim, como visualizado em relação às proteínas LpIRIs, alinhamentos usando a ferramenta *blast* demonstraram um grau de similaridade relevante (41-72%; dados não mostrados) entre DaIRIP1 e os receptores vegetais de fitossulfoquina de diversas espécies de plantas. Exclusivamente, as regiões homólogas entre ambas as proteínas são referentes às porções LRR.

O hormônio peptídico fitossulfoquina está relacionado com a resposta a patógenos, o crescimento vegetal por meio da acentuada expansão celular, comunicação celular,

diferenciação de células do mesófilo, formação de raízes adventícias, além do processo de desenvolvimento do tubo polínico (MATSUBAYASHI *et al.*, 2006; HARTMANN *et al.*, 2015; SAUTER, 2015). Em plantas de tabaco, a adição de fitossulfoquina promoveu taxas de germinação dose-dependentes (CHEN *et al.*, 2000). Neste contexto, STÜHRWOHL D *et al.* (2015) analisaram o efeito do nocaute gênico de *PSR1*, *PSR2* e do gene codificador da proteína tirosil-sulfotransferase (*TPST*, responsável pela adição do grupo sulfônico ao hormônio peptídico) no fenótipo de plantas de *A. thaliana*. Similarmente ao visualizado neste estudo, o nocaute de todos os genes promoveu a redução no tamanho das siliques e também no número de sementes (até 25%), embora o efeito do gene *P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}* visualizado neste trabalho tenha sido mais drástico nas plantas. Ainda segundo STÜHRWOHL D *et al.* (2015), a sinalização mediada por fitossulfoquina é essencial para guiar o tubo polínico ao funículo do óvulo e, ainda que em menor escala, na posterior fecundação para a produção de sementes.

Devido à similaridade encontrada, é possível que DaIRIP1 esteja competindo com PSKs pela ligação do hormônio peptídico. A competição atenuaria as respostas mediadas pelo fitormônio e, em consequência disto, seria responsável pela redução drástica do tamanho das siliques e do número de sementes em plantas de *A. thaliana* contendo o gene *P_{COR15B}-DaIRIP1-T_{nos}*. Outros elementos importantes corroboram com esta hipótese. Por exemplo, o processamento da fitossulfoquina ocorre no apoplasto das células vegetais. Como DaIRIP1 contém um peptídeo-sinal de exportação ao apoplasto, a proteína e o fitormônio estariam disponíveis para a ocorrência de uma interação antes mesmo da fitossulfoquina ser apresentada ao seu receptor PSR. Além disto, a região LRR, presente em PSK e DaIRIP1, é um motivo proteico conhecido por promover interações entre proteínas e peptídeos. Por fim, como citado anteriormente, a expressão gênica sob controle do promotor de *COR15B* ocorre, ainda que em níveis reduzidos em comparação à indução a 4 °C, em temperatura ambiente. Portanto, em virtude da presença de elementos *cis*-atuantes de DNA pólen-específicos, *DaIRIP1* poderia estar sendo expresso na ausência de frio em tecidos reprodutivos. De acordo com FILICHKIN *et al.* (2004), o elemento POLLEN1LELAT52, encontrado ao longo da sequência promotora do gene *LAT52*, foi fundamental para promover a expressão gênica nos grãos de pólen e no tubo polínico de plantas transgênicas de *A. thaliana*. De forma análoga, a sequência GTGA oriunda do gene *g10* de plantas de tabaco foi essencial para a expressão pólen-específica do gene repórter *gusA* em plantas transgênicas (ROGERS *et al.*, 2001).

Contudo, para a confirmação desta hipótese, ensaios de coimunoprecipitação deverão ser realizados para averiguar a ocorrência de interação *in vivo* entre DaRIP1 e fitossulfoquina.

O ciclo reprodutivo de *D. antarctica* varia de acordo com as estações do ano. Durante a transição entre a primavera e o verão, os órgãos reprodutivos são formados e a planta torna-se apta à reprodução sexuada. Todavia, durante a transição entre o outono e o inverno, a planta permanece apenas com os tecidos vegetativos. Sendo assim, sob condições de temperaturas extremas, a reprodução assexuada é o modo dominante de dispersão da espécie (SANDVE *et al.*, 2010). Regimes de baixas temperaturas durante o período de florescimento são um dos principais fatores responsáveis pela baixa qualidade do pólen em *D. antarctica*. Em regiões de climas extremos como as Ilhas de Galinzes e King George, altos índices de pólen estéril foram observados (80,9-95,6%; YUDAKOVA *et al.*, 2012). Efetivos processos de fertilização e reprodução em condições acentuadas de degeneração do pólen podem ser alcançados se as plantas produzirem excessivas quantidades de pólen. Entretanto, a produção de pólen em demasia requer um alto custo energético para as plantas. Além disto, para as espécies de plantas habitantes de regiões congelantes como o continente da Antártida, a economia energética por meio da redução das taxas de polinização é a solução mais viável em condições de frio e deficiências de água no estado líquido, matéria orgânica e minerais (YUDAKOVA *et al.*, 2016). Portanto, a expressão dos genes *DaRIPs* poderia, além de conferir o efeito protetivo de anticongelamento nos tecidos vegetais, promover a regulação do estado reprodutivo, inviabilizando a fecundação por meio da atenuação da resposta via fitossulfoquina em plantas de *D. antarctica* sob baixas temperaturas. Todavia, novos estudos deverão ser realizados para a confirmação desta hipótese.

Por meio de experimentos de microscopia de fluorescência, LADWIG *et al.* (2015) demonstraram que PSR é capaz de interagir com as proteínas ATPases bombeadoras de próton 1 e 2 (H⁺-ATPases; AHA1 e AHA2) e com o receptor de brassinoesteróide (BAK1, do inglês, *brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1*), formando um complexo proteico receptor. Além disto, o complexo formado interage com o canal iônico regulado por nucleotídeos cíclicos (CNGC17, do inglês, *cyclic nucleotide-gated cation channel 17*), embora PSK não seja capaz de ligar-se diretamente à CNGC17. Canais iônicos exercem papel-chave na reprodução sexuada de plantas. Os gradientes de concentração de Ca⁺² na extremidade do tubo polínico são fundamentais para o crescimento e direcionamento do mesmo ao óvulo, uma vez que alteração espacial dos gradientes de concentração de Ca⁺² *in vitro* promovem a reorientação do crescimento do tubo polínico (GAO *et al.*, 2016). A

proteína CNGC18 distribuiu-se assimetricamente nas membranas celulares apresentando a localização mais predominante nas laterais da extremidade do tubo polínico. Além disto, o nocaute gênico de *CNGC18* em *A thaliana* promoveu o crescimento anormal do tubo polínico, promovendo o fenótipo de esterilidade nas plantas (Frietsch *et al.*, 2007; Ladwig *et al.*, 2015), embora a interação da proteína CNGC18 não tenha sido ainda reportada com o complexo PSR-AH1-AHA2-BAK1-CNGC17. Portanto, como hipótese alternativa, DaIRIP1 poderia interagir com ligantes associados à PSK, como por exemplo, proteínas da classe CNGC. Deste modo, esta interação estaria impedindo a formação do complexo proteico e, por fim, o estado reprodutivo das plantas transgênicas.

7. PERSPECTIVAS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Plantas de *A. thaliana* controle e transgênicas contendo o gene de interesse P_{Ppbec1} -*AnAFP-T_{nos}* deverão ser reavaliadas em relação à tolerância ao congelamento por meio de novos ensaios utilizando plantas no mesmo estágio de desenvolvimento e com maiores de tempos de exposição às temperaturas mínimas estabelecidas. Além disto, experimentos de RT-qPCR e *western blot* serão realizados a partir de amostras tissulares de plantas induzidas ou não pelo frio. Sendo assim, será possível avaliar se o gene P_{Ppbec1} -*AnAFP-T_{nos}* está sendo expresso e se é induzível por baixas temperaturas.

Em paralelo, plantas de *Eucalyptus* deverão ser infiltradas com as versões recombinantes do plasmídeo p28_35S_Gateway contendo as sequências *DaIRIP1* e *AnAFP*. Posteriormente, ensaios de RT-qPCR e *western blot* também deverão ser realizados em *Eucalyptus*. Por fim, as plantas tratadas e não tratadas com as versões recombinantes de p28_35S serão avaliadas quanto à obtenção de tolerância ao congelamento.

Além da efetividade das proteínas DaIRIP1 e AnAFP em promover (ou não) a tolerância ao frio e ao congelamento em plantas, as atividades promotoras das sequências P_{Ppbec1} e P_{COR15B} poderão ser comprovadas pela fusão destas a genes repórteres como *gfp* ou *gusA*. A transformação e a regeneração de *A. thaliana* e, finalmente, a avaliação das atividades gênicas e proteicas codificadas em resposta à exposição ao frio deverão ser realizadas para atingir tal objetivo.

8. REFERÊNCIAS

ABE, H.; URAO, T.; ITO, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, v. 15, n. 1, p. 63-78, 2003.

ACR, Associação Catarinense de Empresas Florestais. Anuário Estatístico de Base Florestal para o Estado de Santa Catarina. Disponível em: http://www.acr.org.br/download/biblioteca/ACR_2016.pdf. Acessado em Janeiro de 2018.

AGARWAL, P. K. & JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.

ALTPETER, F.; SPRINGER, N. M.; BARTLEY, L. E.; BLECHL, A. E.; BRUTNELL, T. P.; CITOVSKY, V.; CONRAD, L. J.; GELVIN, S. B.; JACKSON, D. P.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G.; MEDFORD, J. I.; OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; TRICOLI, D. M.; ECK, J. V.; VOYTAS, D. F.; WALBOT, V.; WANG, K.; ZHANG, Z. J.; STEWART, C. N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell*, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

ANTIKAINEN, M.; GRIFFITH, M. Antifreeze protein accumulation in freezing-tolerant cereals. *Physiologia Plantarum*, v. 99, n. 3, p. 423-432, 1997.

ATICI, Ö.; NALBANTOĞLU, B. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, v. 64, n. 7, p. 1187-1196, 2003.

BANERJEE, A. & ROYCHOUDHURY, A. WRKY proteins: signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. *The Scientific World Journal*, v. 2015, 2015.

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

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. D. C. Manual de Transformação Genética de Plantas. 1ª Edição. Brasília, EMBRAPA-SPI, 309 p, 1998.

BREDOW, M.; VANDERBELD, B.; WALKER, V. K. Knockdown of ice-binding proteins in *Brachypodium distachyon* demonstrates their role in freeze protection. *PloS One*, v. 11, n. 12, p. e0167941, 2016.

BREDOW, M. B.; VANDERBELD, B.; WALKER, V. K. Ice-binding proteins confer freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 15, n. 1, p. 68-81, 2017a.

BREDOW, M. B. & WALKER, V. K. Ice-binding proteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 2153, 2017b.

CAI, Y.; LIU, S.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J.; ZHANG, D. Purification and partial characterization of antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum Ait.* *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, n. 2, p. 98-102, 2011.

CAPICCIOTTI, C. J.; DOSHI, M.; BEN, R. N. Ice recrystallization inhibitors: from biological antifreezes to small molecules. In: *Recent developments in the study of recrystallization*. InTech, 2013.

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, 2015.

CARON, B. O.; DE SOUZA, V. Q.; ELOY, E.; BEHLING, A.; SCHMIDT, D.; TREVISAN, R. Resistência inicial de quatro espécies arbóreas em diferentes espaçamentos após ocorrência de geada. *Ciência Rural*, v. 41, n. 5, p. 817-822, 2011.

CHAUHAN, R. D.; VEALE, A.; STRAUSS, S. H.; MYBURG, A. A.; RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M.; AHUJA, M. R. Genetic transformation of *Eucalyptus*-challenges and future prospects. *Tree Biotechnology* Ramawat, KG, Merillon, JM, Ahuja, MR, p. 392-445, 2014.

CHEN, Y.-F.; MATSUBAYASHI, Y.; SAKAGAMI, Y. Peptide growth factor phytosulfokine- α contributes to the pollen population effect. *Planta*, v. 211, n. 5, p. 752-755, 2000.

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, n. 4, 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 & Environment*, v. 35, n. 4, p. 829-837, 2012.

CIF, Centro de Inteligência de Florestas. Disponível em: <http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>. Acesso em Janeiro de 2018.

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, n. 1, p. 132-140, 2014.

DING, Y.; LI, H.; ZHANG, X.; XIE, Q.; GONG, Z.; YANG, S. OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, v. 32, n. 3, p. 278-289, 2015.

DOS SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2001.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p. 11-15, 1987.

DUMAN, J. G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1206, n. 1, p. 129-135, 1994.

DUMAN, J. G & WISNIEWSKI, M. J. The use of antifreeze proteins for frost protection in sensitive crop plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 106, p. 60-69, 2014.

ELOY, E.; CARON, B. O.; TREVISAN, R.; ELLI, E. F.; MONTEIRO, G. C. Ocorrência de geada nas espécies florestais *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus grandis* na região norte do Rio Grande do Sul. *Enciclopédia Biosfera*, v. 9, n. 16, p. 1626-1633, 2013.

EWART, K. V.; LIN, Q.; HEW, C. L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 55, n. 2, p. 271-283, 1999.

FEI, Y.; WEI, L.; GAO, S.; LU, M.; WANG, B.; LI, Z.; ZHANG, Y.; SHU, N.; JIANG, Y.; WANG, W. Isolation, purification and characterization of secondary structure of antifreeze protein from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Chinese Science Bulletin*, v. 46, n. 6, p. 495-498, 2001.

- FEI, Y. B.; CAO, P. X.; GAO, S. Q.; WANG, B.; WEI, L. B.; ZHAO, J. Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, v. 38, n. 2, p. 172-183, 2008.
- FILICHKIN, S. A.; LEONARD, J. M.; MONTEROS, A.; LIU, P. P.; NONOGAKI, H. A novel endo- β -mannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiology*, v. 134, n. 3, p. 1080-1087, 2004.
- FILHO, E. P. & DOS SANTOS, P. E. T. Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no Estado do Paraná. Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 2005.
- FREITAS, S. & BERTI FILHO, E. Efeito da desfolha parcial e total na produção de biomassa de *Eucalyptus grandis* em Mogi Guaçu, São Paulo. IPEF, Piracicaba, n. 47, p. 29-35, 1994.
- GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of *Eucalyptus*. *Physiology and molecular biology of plants*, v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.
- GIT Forest Consulting, 2008 – Disponível em http://gitforestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm. Acesso em Janeiro de 2018.
- GOVER, O.; PERETZ, Y.; MOZES-KOCH, R.; MAORI, E.; RABINOWITCH, H. D.; SELA, I. Only minimal regions of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) are required for replication, expression and movement. *Archives of Virology*, v. 159, n. 9, p. 2263-2274, 2014.
- GRAETHER, S. P.; KUIPER, M. J.; GAGNÉ, S. M.; WALKER, V. K.; JIA, Z.; SYKES, B. D.; DAVIES, P. L. β -Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature*, v. 406, n. 6793, p. 325-328, 2000.
- GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D. S.; HON, W. C.; MOFFATT, B. A. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, v. 100, n. 2, p. 593-596, 1992.
- GRIFFITH, M. & YAISH, M. W. F. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 8, p. 399-405, 2004.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, Joseph. *Molecular cloning: a laboratory manual: three-volume set*. 2012.

GUPTA, R. & DESWAL, R. Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions. *Journal of Biosciences*, v. 39, n. 5, p. 931-944, 2014.

GUPTA, R. & DESWAL, R. Low temperature stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from *Hippophae rhamnoides*, a Himalayan wonder plant. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 5, p. 2684-2696, 2012.

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, n. 6, p. 533-555, 2008.

GWAK, I. G.; JUNG, W.; KIM, H. J.; KANG, S. H.; JIN, E. Antifreeze protein in Antarctic marine diatom, *Chaetoceros neogracile*. *Marine Biotechnology*, v. 12, n. 6, p. 630-639, 2010.

HARTMANN, J.; LINKE, D.; BÖNNIGER, C.; THOLEY, A.; SAUTER, M. Conserved phosphorylation sites in the activation loop of the *Arabidopsis* phytochrome receptor PSKR1 differentially affect kinase and receptor activity. *Biochemical Journal*, v. 472, n. 3, p. 379-391, 2015.

HASSAS-ROUDSARI, M.; & GOFF, H. D. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. *Food Research International*, v. 46, n. 1, p. 425-436, 2012.

HIGA, A. R.; GARCIA, C. H.; DOS SANTOS, E. T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). *Silvicultura*, São Paulo, v. 16, n. 59, p. 40-42, jan./fev. 1995., 1995.

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; de SOUZA, M. V. Comportamento de vinte espécies de *Eucalyptus* em área de ocorrência de geadas na região sul do Brasil. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPT. Colombo: Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. p. 106-110

HIGA, R. C. V.; HIGA, A. R.; TREVISAN, R.; DE SOUZA, M. V. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. Embrapa Florestas, 2000.

HON, W. C.; GRIFFITH, M.; CHONG, P.; YANG, D. S. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology*, v. 104, n. 3, 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, n. 3, p. 879-889, 1995.

HU, Y.; JIANG, L.; WANG, F.; YU, D. Jasmonate regulates the inducer of CBF expression–c-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 25, n. 8, p. 2907-2924, 2013.

HUANG, T. & DUMAN, J. G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara*. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 4, p. 339-350, 2002.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. Relatório anual 2015. Disponível em: http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf. Acesso em Janeiro de 2018.

IBÁ, Indústria Brasileira de Árvores. Relatório anual 2017. Disponível em: IBÁ, 2017 - http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em Janeiro de 2018.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

ISAAA, Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia. Disponível em <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. Acesso em Março de 2018.

JARZĄBEK, M.; PUKACKI, P. M.; NUC, K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). *Cryobiology*, v. 58, n. 3, p. 268-274, 2009.

JIANG, B.; SHI, Y.; ZHANG, X.; XIN, X.; GUO, H.; LI, J.; YANG, S. PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, p. 201706226, 2017.

JINYAO, L. I.; JI, M. A.; ZHANG, F. Recent advances in research of antifreeze proteins. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 21, n. 6, p. 717-722, 2005.

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 & Environment, v. 32, n. 4, p. 336-348, 2009.

KANDASWAMY, K. K.; CHOU, K. C.; MARTINETZ, T.; MÖLLER, 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, n. 1, p. 56-62, 2011.

KAWAHARA, H.; FUJII, A.; INOUE, M.; KITAO, S.; FUKUOKA, J.; OBATA, H. Antifreeze activity of cold acclimated Japanese radish and purification of antifreeze peptide. CryoLetters, v. 30, n. 2, p. 119-131, 2009.

KIDOKORO, S.; WATANABE, K.; OHORI, T.; MORIWAKI, T.; MARUYAMA, K.; MIZOI, J.; HTWE, N. M. P. S.; FUJITA, Y.; SEKITA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. The Plant Journal, v. 81, n. 3, p. 505-518, 2015.

KNIGHT, M. R. & KNIGHT, H. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. New Phytologist, v. 195, n. 4, p. 737-751, 2012.

KONTOGIORGOS, V.; REGAND, A.; YADA, R. Y.; GOFF, H. D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. Journal of Food Biochemistry, v. 31, n. 2, p. 139-160, 2007.

KOZLOWSKI, T. T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. The Botanical Review, v. 58, n. 2, p. 107-222, 1992.

KOVALCHUK, N.; JIA, W.; EINI, O.; MORRAN, S.; PYVOVARENKO, T.; FLETCHER, S.; BAZANOVA, N.; HARRIS, J.; BECK-OLDACH, K.; SHAVRUKOV, Y.; LANGRIDGE, P.; LOPATO, S. Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. Plant Biotechnology Journal, v. 11, n. 6, p. 659-670, 2013.

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, n. 421, 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.; HAWKINS, B.; SHAH, S. Overexpression of a western white pine PR10 protein enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 114, n. 2, p. 217-223, 2013.
- LIU, Z.; JIA, Y.; DING, Y.; SHI, Y.; LI, Z.; GUO, Y.; GONG, Z.; YANG, S. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. *Molecular Cell*, v. 66, n. 1, p. 117-128. e5, 2017.
- LU, C.; YIN, L.; LI, K. Proteome expression patterns in the stress tolerant evergreen *Ammopiptanthus nanus* under conditions of extreme cold. *Plant Growth Regulation*, v. 62, n. 1, p. 65-70, 2010.
- MAGATON, A. S.; de OLIVEIRA, R.; LOPES, O. R.; MILAGRES, F. R. Composição química da madeira de espécies de Eucalipto. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006.
- MALABARBA, J.; BUFFON, V.; MARIATH, J. E. A.; MARASCHIN, F. S.; MARGIS-PINHEIRO, M.; PASQUALI, G.; REVERS, L. F. Manipulation of VviAGL11 expression changes the seed content in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Science*, v. 269, p. 126-135, 2018.
- MARENTES, E.; GRIFFITH, M.; MLYNARZ, A.; BRUSH, R. A. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, v. 87, n. 4, p. 499-507, 1993.
- MATSUBAYASHI, Y.; OGAWA, M.; KIHARA, H.; NIWA, M.; SAKAGAMI, Y. Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phytosulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiology*, v. 142, n. 1, p. 45-53, 2006.
- MEGHA, S.; BASU, U.; KAV, N. N. V. Metabolic engineering of cold tolerance in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 88-95, 2014.

MIDDLETON, A. J.; MARSHALL, C. B.; FAUCHER, F.; BAR-DOLEV, M.; BRASLAVSKY, I.; CAMPBELL, R. L.; WALKER, V. K.; DAVIES, P. L. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. *Journal of Molecular Biology*, v. 416, n. 5, p. 713-724, 2012.

MOFFATT, B.; EWART, V.; EASTMAN, A. Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiologia Plantarum*, v. 126, n. 1, 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. *Journal of Bioinformatics and Sequence Analysis*, v. 3, n. 4, p. 70-88, 2011.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.;... & GOODSTEIN, D. M. The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature*, v. 510, n. 7505, p. 356, 2014.

NAKAMURA, T.; ISHIKAWA, M.; NAKATANI, H.; ODA, A. Characterization of cold-responsive extracellular chitinase in bromegrass cell cultures and its relationship to antifreeze activity. *Plant Physiology*, v. 147, n. 1, p. 391-401, 2008.

NAKASHIMA K.; FUJITA, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; Yamaguchi-Shinozak, K. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including *RD29B* and *RD29A* in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, v. 60, n. 1, p. 51-68, 2006.

PARK, S.; LEE, C. M.; DOHERTY, C. J.; GILMOUR, S. J.; KIM, Y.; THOMASHOW, M. F. Regulation of the *Arabidopsis* CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *The Plant Journal*, v. 82, n. 2, p. 193-207, 2015.

PERETZ, Y.; MOZES-KOCH, R.; AKAD, F.; TANNE, E.; CZOSNEK, H.; SELA, I. A universal expression/silencing vector in plants. *Plant physiology*, v. 145, n. 4, p. 1251-1263, 2007

ROGERS, H. J.; BATE, N.; COMBE, J.; SULLIVAN, J.; SWWETMAN, J.; LONSDALE, D. M.; TWELL, D. Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Molecular Biology*, v. 45, n. 5, p. 577-585, 2001.

- SANDVE, S. R.; RUDI, H.; ASP, T.; ROGNLI, O. A. Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses. *BMC Evolutionary Biology*, v. 8, n. 1, p. 245, 2008.
- SANDVE, S. R. Genetics of Pooideae freezing tolerance: an evolutionary perspective. Norwegian University of Life Sciences, Ås, 2010.
- SAUTER, M. Phytosulfokine peptide signalling. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 17, p. 5161-5169, 2015.
- SCHOLANDER, P. F.; VAN DAN, L.; KANWHISER, J. W.; HAMMEL, H. T.; GORDON, M. S. Supercooling and osmoregulation in Arctic fish. *Journal of Cellular Physiology*, v. 49, n. 1, p. 5-24, 1957.
- SIDEBOTTOM, C.; BUCKLEY, S.; PUDNEY, P.; TWIGG, S.; JARMAN, C.; HOLT, C.; TELFORD, J.; MCARTHUR, A.; WORRALL, D.; HUBBARD, R.; LILLFORD, P. Phytochemistry: heat-stable antifreeze protein from grass. *Nature*, v. 406, n. 6793, p. 256, 2000.
- SIMPSON, S. D.; NAKASHIMA, K.; NARUSAKA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal*, v. 33, n. 2, p. 259-270, 2003.
- SIMPSON, D. J.; SMALLWOOD, M.; TWIGG, S.; DOUCET C. J.; ROSS, J.; BOWLES D. J. Purification and characterization of an antifreeze protein from *Forsythia suspensa* (L.). *Cryobiology*, v. 51, n. 2, p. 230-234, 2005.
- SMALLWOOD, M.; WORRALL, D.; BYASS, L.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; DOUCET, C. J.; HOLT, C.; TELFORD, J.; LILLFORD, P.; BOWLES, D. J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). *Biochemical Journal*, v. 340, n. Pt 2, p. 385-391, 1999.
- 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.
- STÜHRWOHLDT, N.; DAHLKE, R. I.; KUTSCHMAR, A.; PENG, X.; SUN, M. X.; SAUTER, M. Phytosulfokine peptide signaling controls pollen tube growth and funicular

pollen tube guidance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v. 153, n. 4, p. 643-653, 2015.

SUN, C.; PALMQVIST, S.; OLSSON, H.; BORÉN, M.; AHLANDSBERG, S.; JANSSON, C. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the iso1 promoter. *The Plant Cell*, v. 15, n. 9, p. 2076-2092, 2003.

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, n. 1, p. 121, 2009.

TSUCHIHARA, A.; HANBA, Y. T.; KATO, N.; DOI, T.; KAWAZU, T.; MAESHIMA, M. Effect of overexpression of radish plasma membrane aquaporins on water-use efficiency, photosynthesis and growth of *Eucalyptus* trees. *Tree Physiology*, v. 30, n.3, p. 417-430, 2010.

URAO, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell*, v. 5, n. 11, p. 1529-1539, 1993.

USTUN, N. S. & TURHAN, S. Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 39, n. 6, p. 3189-3197, 2015.

XU, Z. S.; NI, Z. Y.; LIU, L.; NIE, L. N.; LI, L. C.; CHEN, M.; MA, Y. Z. t, v. 280, n. 6, p. 497-508, 2008.

WANG, Y.; QIU, L.; DAI, C.; WANG, J., LUO, J.; ZHANG, F.; MA, J. Expression of insect (*Microdera puntipennis dzungarica*) antifreeze protein MpAFP149 confers the cold tolerance to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports*, v. 27, n. 8, p. 1349-1358, 2008.

WANG, W.; WEI, L.; WANG, G. Multistep purification of an antifreeze protein from *Ammopiptanthus mongolicus* by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal of Chromatographic Science*, v. 41, n. 9, p. 489-493, 2003.

WORRALL, D.; ELIAS, L.; ASHFORD, D.; SMALLWOOD, M.; SIDEBOTTOM, C.; LILLFORD, P.; TELFORD, J.; HOLT, C.; BOWLES, D. A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science*, v. 282, n. 5386, p. 115-117, 1998.

YEH, S.; MOFFATT, B. A.; GRIFFITH, M.; XIONG, F.; YANG, D. S. C.; WISEMAN, S. B.; SARHAN, F.; DANYLUK, J.; XUE, Y. Q.; HEW, C. L.; DOHERTY-KIRBY, A.; LAJOIE, G. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology*, v. 124, n. 3, p. 1251-1264, 2000.

YU, S.; YIN, L.; MU, S. Discovery of an antifreeze protein in the leaves of *Ammopiptanthus nanus*. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 90, n. 1, p. 35-40, 2010.

YUDAKOVA, O. I.; SHAKINA, T. N.; TYRNOV, V. S.; KUNAKH, V. A.; KOZERETSKAYA, I. A.; PARNIKOZA, I. Y. The quality of pollen and the characteristics of microgametophyte in Antarctic populations of *Deschampsia antarctica* E. Desv., *Byull. Bot. Sada Saratov. Univ.*, 2012, no. 10, pp. 203–207, 2012.

YUDAKOVA, O. I.; TYRNOV, V. S.; KUNAKH, V. A.; KOZERETSKAYA, I. A.; PARNIKOZA, I. Y. Adaptation of the seed reproduction system to conditions of Maritime Antarctic in *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Russian Journal of Developmental Biology*, v. 47, n. 3, p. 138-146, 2016.

ZHANG, Z. L.; XIE, Z.; ZOU, X.; CASARETTO, J.; HO, T. H. D.; SHEN, Q. J. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, v. 134, n. 4, p. 1500-1513, 2004

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, n. 2, p. 641-646, 2006.

ZHANG, S. H.; WEI, Y.; LIU, J. L.; YU, H. M.; YIN, J. H.; PAN, H. Y.; BALDWIN, T. C. An apoplastic chitinase CpCHT1 isolated from the corolla of wintersweet exhibits both antifreeze and antifungal activities. *Biologia Plantarum*, v. 55, n. 1, p. 141-148, 2011.

9. CURRÍCULO VITAE

SULIS, D.B

1. Dados Pessoais

Nome: Daniel Barletta Sulis

Local e Data de Nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil em 05 de Outubro de 1991

E-mail: daniel276@hotmail.com

2. Formação Acadêmica

Curso de Graduação:

Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Março de 2012 à Fevereiro de 2016

Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* (Mestrado):

Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Abril de 2016 à Maio de 2018

3. Estágios

Bolsista de iniciação científica CNPq no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Janeiro de 2014 à Fevereiro de 2016 de 2013. Projeto: Sequências Nucleotídicas Capazes de Conferir Tolerância ao Frio e/ou ao Congelamento em Plantas.

Estagiário Técnico na Empresa ACTGene - Análises Moleculares LTDA, de Janeiro de 2014 à Setembro de 2014.

Iniciação científica voluntário no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Agosto de 2013 à Dezembro de 2013. Projeto: Hibridização de Southern blot para Detectar Eventos de Transgenia em Plantas.

Bolsista de iniciação científica FAPERGS do Laboratório de Proteínas Tóxicas, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Julho de 2012 à Agosto de 2013. Projeto: Purificação e caracterização da urease recombinante de *Proteus mirabilis*.

4. Prêmios e Distinções

Destaque com indicação ao prêmio de Jovem Pesquisador do Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na sessão de Biotecnologia. Porto Alegre, Outubro de 2015.

5. Experiência Profissional ou Didática Anterior

Preparação e lecionamento de 15 h aula das disciplinas de Biossegurança (BIO12013) e Bases Moleculares para Engenharia Genética de Alimentos (BIO12010) para os Cursos de Graduação de Biotecnologia e Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, respectivamente.

6. Resumos Publicados em Anais de Congressos

Evaluation of the Ability of Synthetic Genes to Confer Cold or Freezing Tolerance in Plants (SULIS, D.B.; PASQUALI, G). 6º Congresso Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, Sociedade Brasileira de Genética. Ouro Preto, Maio de 2017.

Acidic Endopeptidases from *Canavalia ensiformis* Seeds (SULIS, D.B.; Broll, V.; Nunes, L.; Fettermann-Oliveira, T.; Postal, M.; Demartini, D.R.; Carlini, C.R). 41º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,

Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Foz do Iguaçu, Maio de 2012.