

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THÁIS SALETE GIOVANELLA

**ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x  
*Populus alba* A PARTIR DE RAÍZES E VALIDAÇÃO DE PROMOTORES RAIZ-  
ESPECÍFICOS**

CURITIBA

2017

THAÍS SALETE GIOVANELLA

**ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x  
*Populus alba* A PARTIR DE RAÍZES E VALIDAÇÃO DE PROMOTORES RAIZ-  
ESPECÍFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalok Filho.  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Juliana Degenhardt-Goldbach.

CURITIBA

2017

G512 Giovanella, Thaís Salete

Organogênese e transformação genética de *Populus tremula* x *Populus alba* a partir de raízes e validação de promotores raiz-específicos / Thaís Salete Giovanella. Curitiba: 2017.  
101 f.; il.

Orientador: João Carlos Bepalhok Filho  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Plantas – Melhoramento genético. 2. Raízes (Botânica).  
3. Crescimento (Plantas). I. Bepalhok Filho, João Carlos.  
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós – Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.  
III. Título.

CDU 581.43



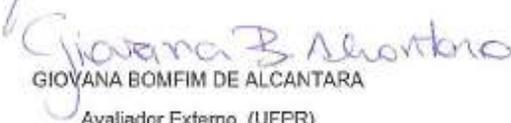
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

## TERMO DE APROVAÇÃO

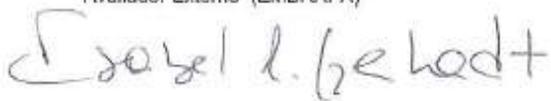
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAIS SALETE GIOVANELLA** intitulada: **ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula x Populus alba* A PARTIR DE RAÍZES E VALIDAÇÃO DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 24 de Março de 2017.

  
JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JULIANA DEGENHARDT GOLDBACH  
Avaliador Externo (EMBRAPA)

  
ISABEL RODRIGUES GERHARDT  
Avaliador Externo (EMBRAPA)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção vegetal por tornar possível a realização do mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro. À Embrapa Florestas, por permitir o uso de laboratórios e equipamentos durante todo projeto.

Ao professor Dr. João Carlos Bernaldo de Figueiredo Filho, pela confiança, oportunidade que me concedeu e por acreditar no meu trabalho. Pela orientação, ensinamentos, calma, paciência e por estar sempre disponível em todos os momentos.

À Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach, por acreditar em mim desde o início e tornar essa experiência uma realidade, pela ótima convivência todos os dias, por confiar no meu trabalho, pela motivação sempre, pela orientação excepcional, pelo carinho, pela amizade, por sempre me auxiliar em tudo que precisei, pelos momentos em que tive dúvidas e você me fez acreditar novamente e mais infinitas coisas que fez por mim, não tenho palavras que descrevam o quanto sou agradecida a você.

À banca de pré-defesa composta pelo professor Dr. João Carlos Bernaldo de Figueiredo Filho, pela professora Dra. Giovana Bomfim de Alcantara e pela Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach pelas sugestões, críticas e correções que tornaram esse trabalho melhor.

À Janaina Cassia Campos e Marianne Bernardes pelos ensinamentos, ajuda nos laboratórios, pela amizade e apoio.

À Cassiana de Oliveira e Laudiane Bruna Zanella, pela amizade verdadeira que construímos, por todos os momentos que passamos juntas, dificuldades e alegrias, pelos sonhos que compartilhamos, por me ajudarem em tantas situações e sempre estarem presentes, vocês sem dúvida tornaram a rotina no laboratório mais divertida e essa experiência não teria sido tão especial e gratificante sem a presença de vocês.

Aos meus pais Edgar João Giovanella e Ivani Sesse Giovanella que sempre me confortaram, me apoiaram, me deram força, acreditaram em mim, e apesar da distância sempre se tornaram presentes em todos os momentos, fizeram o possível e o impossível para me ajudar, nada disso seria realidade sem vocês, sem dúvida as pessoas mais importantes na minha caminhada. À minha irmã Tânia Mara Giovanella que também sempre me deu forças em todos os momentos e comemorou comigo cada conquista.

Ao meu namorado Arthur Navarro de Souza, pelas palavras de ânimo que me deram força nos momentos de dificuldade, por sempre estar presente e me ajudar sem pensar duas vezes ao longo dessa caminhada, serei sempre grata por tudo o que fez por mim.

À todos que não foram citados aqui, mas que de alguma maneira também contribuíram na realização desse trabalho

Caímos em todos os tipos de armadilhas ao tentarmos ser historiadores do presente. Mas, talvez, a mais séria, especialmente em tempos excitantes como o nosso, é que a história pode acontecer muito mais rápido do que um acadêmico (pelo menos, um acadêmico como eu) pode escrever.

Keller

## RESUMO

A genômica funcional juntamente à transformação genética e posterior regeneração *in vitro* têm sido utilizadas na identificação de genes e promotores de interesse, compreendendo ferramentas essenciais no desenvolvimento de plantas com características superiores. Diante disto, no primeiro capítulo objetivou-se o estabelecimento de protocolos de organogênese e transformação genética de *Populus tremula x Populus alba* clone 717-1B4 utilizando raízes como explantes, os quais são pouco descritos em literatura. Foram testadas as citocininas zeatina, cinetina e BAP nas concentrações 2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ , diferentes concentrações de zeatina (7, 14 e 21  $\mu\text{M}$ ), e a influência da idade dos explantes (2 a 6 meses desde a última repicagem). Foram avaliados a porcentagem de explantes responsivos e número brotos por explante aos 30 e 60 dias. Com o uso de zeatina e BAP foram obtidas as maiores porcentagens de explantes responsivos, 82,5 e 83,75% nas concentrações de 8,8 e 2,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Porém, com o BAP, os brotos apresentaram morfologia anormal e, devido a isso, a zeatina foi escolhida. Quando testadas diferentes concentrações de zeatina não foram observadas diferenças estatísticas quanto à porcentagem de explantes responsivos, e quanto à idade, aos 30 dias, raízes “velhas” (6 meses) apresentaram maior porcentagem de explantes responsivos do que “jovens” (2 meses), porém, aos 60 dias as respostas foram estatisticamente iguais. Nos experimentos de transformação genética foram testados diferentes tempos de ultrassom (30 e 60 s), o efeito do ultrassom na viabilidade da *Agrobacterium* e a influência do co-cultivo líquido ou semissólido. No experimento de diferentes períodos de ultrassom, ainda não foram realizadas as análises de biologia molecular. Com relação a viabilidade da *Agrobacterium* durante o ultrassom foi observado que a bactéria não foi afetada negativamente. Dentre os diferentes tipos de co-cultivo foi observado que o meio semissólido é o mais adequado. No segundo capítulo, foi realizada a transformação genética de *P. tremula x P. alba* clone 717-1B4 e *Nicotiana tabacum*, para a validação dos promotores raiz-específicos *Eucgr.C00918* e *Eucgr.G02172* isolados de *E. grandis*. Em *Nicotiana tabacum* o promotor *Eucgr.C00918* não apresentou a atividade esperada, não havendo expressão do gene *gus*. Em *Populus*, o promotor *Eucgr.G02172* conduziu a uma fraca/ausente expressão do gene *gus*. No entanto, o gene dirigido pelo promotor utilizado foi isolado de plantas adultas de *Eucalyptus*, sendo necessária repetição do teste histoquímico nestas condições para *Populus*.

**Palavras-chave:** Transformação genética. Plantas modelo. Genômica funcional.

## ABSTRACT

Functional genomics along with genetic transformation and subsequent in vitro regeneration have been used in the identification of genes and promoters of interest, comprising essential tools in the development of plants with superior characteristics. Therefore, in the first chapter the objective was to establish protocols for organogenesis and genetic transformation of *Populus tremula x Populus alba* clone 717-1B4 using roots as explants, which are little described in the literature. Were tested the cytokinins zeatin, kinetin and BA at concentrations of 2.2, 4.4 and 8.8  $\mu\text{M}$ , different concentrations of zeatin (7, 14 and 21  $\mu\text{M}$ ), and the influence of age of the explants (2 and 6 months old). Were evaluated the percentage of responsive explants and number of shoots per explant at 30 and 60 days. With the use of zeatin and BA, the highest percentages of responsive explants were obtained, 82.5 and 83.75% in concentrations of 8.8 and 2.2  $\mu\text{M}$ , respectively. However, using BA the shoots showed abnormal morphology and due to this, zeatin was chosen. When different zeatin concentrations were tested, no statistical differences were observed in the percentage of responsive explants, and as for age, at 30 days, old roots (6 months old) had a higher percentage of responsive explants than young roots (2 months old), but at 60 days the responses didn't differ statistically. In the genetic transformation experiments were tested different periods of sonication (30 and 60 s), the effect of sonication on the viability of *Agrobacterium* and the influence of liquid or semi-solid co-cultivation. In the experiment of different periods of sonication the molecular biology analyzes weren't performed yet. When evaluating the viability of *Agrobacterium* during sonication it was observed that the bacterium was not negatively affected. Among the different types of co-cultivation it was observed that the semi-solid medium is the most suitable. In the second chapter, the genetic transformation of *P. tremula x P. alba* clone 717-1B4 and *Nicotiana tabacum* was performed for the validation of the *Eucgr.C00918* and *Eucgr.G02172* root-specific promoters isolated from *E. grandis*. In *Nicotiana tabacum* the promoter *Eucgr.C00918* didn't show the expected activity not having expression of the *gus* gene. For *Populus*, the promoter *Eucgr.G02172* led to a weak/abscent expression of the *gus* gene. However, the gene under control of this promoter was isolated from adult *Eucalyptus* plants, requiring a repetition of the histochemical test under these conditions for *Populus*.

**Key-words:** Genetic transformation. Model plants. Functional genomics.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- REGIÕES PRINCIPAIS DE UM PROMOTOR DE GENE.....18
- FIGURA 2- PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21 CARREGANDO OS GENES REPÓRTERES *gus* E *gfp* SOB CONTROLE DO PROMOTOR *Eucgr.G02172*.....44
- FIGURA 3- BROTOS A PARTIR DE RAÍZES DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 PROVENIENTES DO EXPERIMENTO COM DIFERENTES REGULADORES AOS 30 DIAS. A. 8,8 µM DE ZEATINA. B. 2,2 µM DE BAP.....52
- FIGURA 4- PLANTA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 48 DIAS .....53
- FIGURA 5- ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 DO TRATAMENTO DE ULTRASSOM SEM A BACTÉRIA.....60
- FIGURA 6- ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 DO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM A BACTÉRIA.....60
- FIGURA 7- ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 NO TRATAMENTO DE CO-CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....63
- FIGURA 8- ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 NO TRATAMENTO DE CO-CULTIVO EM MEIO SEMISSÓLIDO.....63
- FIGURA 9- PLASMÍDEOS pCAMBIA 1303 CARREGANDO OS GENES REPÓRTERES *gus* E *gfp* SOB CONTROLE DOS PROMOTORES

	<i>Eucgr.C00918</i>	(A)	<i>E</i>	<i>Eucgr.G02172</i>	
	(B).....				77
FIGURA 10-	ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO GENE <i>gus</i> DE 400pb E DA REGIÃO PROMOTORA <i>Eucgr. C00918</i> DE 1 KB COM DNA DE <i>Nicotiana tabacum</i> TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09.....				84
FIGURA 11-	EVENTOS DE <i>Nicotiana tabacum</i> TRANSFORMADOS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09 EM VASOS EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 15 E 30 DIAS E CONTROLE NÃO TRANSFORMADO AOS 30 DIAS.....				85
FIGURA 12-	FOLHAS E RAÍZES DE 3 EVENTOS DE <i>Nicotiana tabacum</i> TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09 SUBMETIDOS AO TESTE DE GUS AOS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E PLANTA DE <i>Nicotiana tabacum</i> UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO.....				86
FIGURA 13-	ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE <i>gus</i> DE 400pb COM DNA DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> clone 717-1B4 TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09.....				90
FIGURA 14-	ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE <i>gus</i> DE 400pb COM DNA DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21.....				90
FIGURA 15-	PLANTAS DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21 SUBMETIDAS AO TESTE DE GUS E CONTROLE POSITIVO DE <i>Nicotiana tabacum</i> TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303.....				91

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CITOCININAS ZEATINA, CINETINA E BAP EM 3 CONCENTRAÇÕES (2,2, 4,4 e 8,8 $\mu$ M) AOS 30 DIAS.....	48
TABELA 2-	NÚMERO DE BROTO POR EXPLANTE DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CITOCININAS ZEATINA, CINETINA E BAP EM 3 CONCENTRAÇÕES (2,2, 4,4 e 8,8 $\mu$ M) AOS 30 DIAS.....	49
TABELA 3-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTO POR EXPLANTE DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEATINA (7, 14 e 21 $\mu$ M) AOS 30 DIAS.....	53
TABELA 4-	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 ACLIMATIZADAS E TRANSPLANTADAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 30 DIAS.....	53
TABELA 5-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTO POR EXPLANTE DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DA IDADE DA RAÍZ AOS 30 DIAS.....	54
TABELA 6-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTO POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU DIFERENTES PERÍODOS DE ULTRASSOM (30 E 60 s) NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21.....	56

TABELA 7-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTOS POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU O EFEITO DO ULTRASSOM NA VIABILIDADE DA <i>Agrobacterium</i> NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21.....	59
TABELA 8-	PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTOS POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DO CO-CULTIVO SEMISSÓLIDO OU LÍQUIDO NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIB	- Ácido indolbutírico
ANA	- Ácido naftalenoacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
CaMV 35S	- Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
cDNA	- DNA complementar
CQB	- Certificado de Qualidade em Biossegurança
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	- Densidade ótica
<i>gfp</i>	- Gene codificante da proteína verde fluorescente
<i>gus</i>	- Gene codificante da enzima $\beta$ -glucuronidase
<i>hptII</i>	- Gene da higromicina fosfotransferase
Kb	- Kilobases
KCl	- Cloreto de Potássio
Mg <sub>2</sub>	- Magnésio
MS	- Meio de Murashige e Skoog (1962)
MS/2	- Meio de Murashige e Skoog com a concentração de sais reduzida à metade
ng	- Nanogramas
<i>npII</i>	- Gene da neomicina fosfotransferase II
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
RNA	- Ácido ribonucleico
rpm	- Rotações por minuto
Taq	- DNA polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	- DNA de transferência
TDZ	- Thidiazuron
WPM	- “Woody Plant Medium” (Lloyd e Mccown, 1980)
X-gluc	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronideo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	GENÔMICA FUNCIONAL .....	16
2.2	ISOLAMENTO DE GENES E PROMOTORES ESPECÍFICOS .....	17
2.3	VALIDAÇÃO DE GENES EM PLANTAS MODELO.....	21
2.4	ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS .....	24
2.5	ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus A</i> PARTIR DE RAÍZES .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>ORGANOGENESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus</i></b> <b><i>tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 ATRAVÉS DE RAÍZES</b> .....	<b>37</b>
	RESUMO.....	37
	ABSTRACT.....	38
<b>4</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	41
5.2	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>Populus tremula x</i> <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4.....	41
5.3	ORGANOGENESE A PARTIR DE RAÍZES DE <i>Populus tremula x Populus</i> <i>alba</i> CLONE 717-1B4.....	41
5.3.1	Efeito de diferentes citocininas .....	42
5.3.2	Efeito de diferentes concentrações de zeatina .....	42
5.3.3	Efeito da idade da raiz .....	42
5.4	ACLIMATIZAÇÃO.....	43
5.5	AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
5.6	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4.....	43
5.6.1	Cepa bacteriana e plasmídeo.....	43
5.6.2	Procedimento geral de transformação genética de <i>Populus tremula x</i> <i>Populus alba</i> clone 717-1B4.....	44
5.6.3	Efeito de diferentes períodos de ultrassom .....	45

5.6.4	Efeito do ultrassom na viabilidade da <i>Agrobacterium</i> .....	46
5.6.5	Efeito de co-cultivo líquido em meio MS/2 ou semissólido em meio WPM...	46
5.7	ANÁLISE MOLECULAR DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4.....	46
5.7.1	Extração de DNA e PCR .....	46
5.8	AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
6.1	ORGANOGENESE A PARTIR DE RAÍZES DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4.....	47
6.1.1	Efeito de diferentes citocininas .....	47
6.1.2	Efeito da concentração de zeatina.....	52
6.1.3	Efeito da idade das raízes na organogênese .....	54
6.2	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 .....	56
6.2.1	Efeito de diferentes períodos de ultrassom .....	56
6.2.2	Efeito do ultrassom na viabilidade da <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	59
6.2.3	Efeito de co-cultivo líquido em meio MS/2 ou semissólido em meio WPM...	61
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>VALIDAÇÃO DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE <i>Eucalyptus grandis</i> EM <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 E <i>Nicotiana tabacum</i>.....</b>	<b>72</b>
	RESUMO.....	72
	ABSTRACT.....	73
<b>9</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>76</b>
10.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>Nicotiana tabacum</i> e <i>Populus tremula x Populus alba</i> CLONE 717-1B4 .....	76
10.1.1	Cepa bacteriana e plasmídeo.....	77
10.1.2	Transformação de <i>Escherchia coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	77
10.2	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana tabacum</i> COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09 .....	79

10.3	ACLIMATIZAÇÃO.....	80
10.4	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717-1B4 COM OS PLASMÍDEOS pCAMBIA 1303 A09 E B21 .....	80
10.5	ANÁLISE MOLECULAR DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 717- 1B4 E <i>Nicotiana tabacum</i> .....	81
10.5.1	Extração de DNA e PCR .....	81
10.5.2	Teste histoquímico de GUS .....	83
10.6	AVALIAÇÕES.....	83
<b>11</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
11.1	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Nicotiana tabacum</i> COM O PLASMÍDEO PCAMBIA 1303 A09.....	83
11.2	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE <i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i> CLONE 771-1B4 COM OS PLASMÍDEOS pCAMBIA 1303 A09 E pCAMBIA 1303 B21.....	89
<b>12</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>13</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A biotecnologia tem se tornado cada vez mais presente no dia a dia do homem, e vem auxiliando na solução de vários problemas nas mais diversas áreas, como alimentação, saúde e produção de energia. Através da transformação genética de espécies vegetais se tornou possível aumentar produções, gerar genótipos mais resistentes a estresses bióticos e abióticos e também produtos de maior valor agregado, como valor energético, por exemplo, de maneira mais rápida e com a possibilidade de transferência de genes de qualquer organismo, diferentemente do melhoramento convencional (YE et al., 2011; ISAAA, 2014).

Para as espécies florestais, ainda existe um longo caminho a ser percorrido. Devido ao caráter perene das plantas, várias questões científicas e filosóficas ainda fazem com que a geração e plantio de árvores transgênicas não sejam uma realidade. Com exceção da China e recentemente de um evento de *Eucalyptus* transgênico no Brasil, no mundo não existem outras áreas com plantios comerciais de espécies florestais transgênicas (PORTH; EL-KASSABY, 2014; MEI, 2015). Entretanto, a exemplo das espécies agrônômicas, os pesquisadores acreditam que ganhos consideráveis podem ser obtidos se genes de interesse forem inseridos em espécies florestais para a produção de madeira, celulose ou mesmo energia. Por conseguinte, a busca por genes de interesse é uma realidade em vários centros de pesquisa e universidades ao redor do mundo.

A genômica funcional é a área da genômica responsável pela busca, isolamento e caracterização de genes de um indivíduo, estabelecendo as relações entre as sequências de DNA e as características fenotípicas do organismo. Estudos envolvendo a genômica funcional apresentam grande potencial na agricultura e biotecnologia, pois, a grande diversidade encontrada nas plantas, permite a identificação de novos genes, os quais podem ser relacionados a características agrônômicas de interesse ampliando as possibilidades de melhoramento genético das espécies (HOLTORF; GUITTON; RESKI, 2002).

Dentre as várias funções, a tolerância a estresses abióticos é almejada e vários genes têm sido isolados com essa função em diferentes espécies vegetais. No entanto, a expressão de genes de resistência em plantas utilizando promotores constitutivos vem demonstrando demandar um grande gasto fisiológico, e uma das consequências muito comuns é o fenótipo anão (DE LA TORRE et al., 2014; ).

Promotores são sequências de DNA localizadas anteriormente à região codificadora dos genes, que contém sítios específicos para proteínas iniciadoras e reguladoras da transcrição, desta maneira coordenando a expressão dos genes. Podem ser classificados em quatro grupos: constitutivos, específicos, induzíveis e sintéticos. Os promotores constitutivos conduzem a expressão do transgene a níveis constantes em todos os tecidos e durante todo o ciclo de vida da planta. Diferentemente, os específicos delimitam a expressão a certos tecidos, órgãos, células ou estágios de desenvolvimento. No caso dos induzíveis, a expressão dos genes é modulada em resposta a sinais endógenos e estímulos externos físicos ou químicos, enquanto que os sintéticos combinam diferentes regiões promotoras, podendo assim promover perfis de expressão que não ocorrem na natureza (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Uma estratégia para diminuir os gastos metabólicos com os genes de tolerância a estresses é a sua expressão somente durante um período, sob algum estresse, ou ainda em determinado órgão da planta (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). Surge, portanto, a necessidade de se isolar tais promotores, através do isolamento, por exemplo, de genes expressos somente em raízes, no caso de tolerância à seca.

No entanto, somente o isolamento e sequenciamento dos genes não garantem o conhecimento de sua função, assim como o isolamento de um promotor de um gene expresso preferencialmente em raízes não garante que quando usado na transformação genética de plantas, este seja expresso conforme o esperado. Portanto, após isolados, os genes devem ter sua função validada. Para tanto, o uso de plantas modelo vem sendo de extrema utilidade (LU et al., 2007).

Plantas modelo são espécies amplamente estudadas visando a elucidação de fenômenos biológicos particulares, com a expectativa de que as descobertas auxiliem a compreensão destes fenômenos em outros organismos (DELATORRE; SILVA, 2008). Estes indivíduos devem apresentar certas características como: genoma pequeno, facilidade na manipulação *in vitro* e transformação genética.

Dentre os sistemas modelo extensivamente utilizados destacam-se a *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*) e os gêneros *Nicotiana* e *Populus*. A *Arabidopsis thaliana* é de longe a planta modelo mais bem desenvolvida, assim como *Nicotiana tabacum*, a primeira planta transformada geneticamente. No entanto, muitas características observadas em espécies florestais, não podem ser estudadas

nestes organismos, o que levou a procura de alternativas como plantas modelo, como por exemplo, o gênero *Populus*. Indivíduos deste grupo, portanto, passaram a ser utilizados como modelo para espécies perenes lenhosas, devido a características como: facilidade na propagação vegetativa, transformação genética e regeneração e também rápido crescimento (STOBRAWA, 2014; BRADSHAW et al., 2000).

Um dos principais preceitos de uma planta modelo é que estas tenham protocolos eficientes de organogênese e transformação genética disponíveis. Portanto, por mais eficientes que sejam, otimizações em tais protocolos são sempre interessantes e visam diminuir os custos e a mão de obra com a cultura de tecidos.

Diversos trabalhos com organogênese de *Populus* já foram publicados e os tipos de explantes vegetais utilizados com maior frequência são foliares e segmentos caulinares. Poucos autores descrevem o uso de raízes como explantes, as quais apresentam inúmeras vantagens quando comparadas aos demais, pois apresentam menor oxidação, podem fornecer elevado número de brotos regenerados e alta suscetibilidade à *Agrobacterium tumefaciens* (SON; HALL, 1990; MÁRTON; BROWSE, 1991).

Portanto, este trabalho teve por objetivo desenvolver um protocolo de organogênese e transformação genética a partir de raízes para *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4, e validar a função de promotores específicos de raízes, isolados de *Eucalyptus grandis*, em plantas modelo de *Populus* e *Nicotiana tabacum*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 GENÔMICA FUNCIONAL

Dados publicados pela Organização das Nações Unidas (ONU) no relatório "Perspectivas da População mundial: A Revisão de 2015" mostram que é esperado um aumento na população atual, que compreende aproximadamente 7,3 bilhões, para 8,5 bilhões até o ano de 2030 (UNITED NATIONS, 2015). Este aumento reflete na necessidade de incrementar a produtividade, utilizando uma área de cultivo menor, para compensar o constante aumento da demanda de madeira e reduzir a pressão sobre florestas nativas (BOERJAN, 2005). Portanto, espécies comerciais com características superiores são cada vez mais desejadas e a introdução de genes específicos nas plantas de maneira controlada se tornou possível com o surgimento das ferramentas biotecnológicas.

Desde a descoberta da fita de dupla hélice de DNA, muito já foi desvendado a respeito da hereditariedade e do funcionamento dos genes. O avanço dos estudos na área da biologia molecular evoluiu até a engenharia genética, que possibilitou a manipulação de características pontuais de organismos, através da transformação genética. A partir de então, a busca por genes de interesse se tornou rotina em vários laboratórios.

Uma ferramenta de extrema importância para o desenvolvimento de plantas transgênicas é a genômica funcional, uma abordagem que visa a descoberta da função biológica de genes particulares e como conjuntos de genes e seus produtos trabalham juntos (ABDEEVA; ABDEEV, 2016). Informações sobre a função hipotética do gene em estudo podem ser primeiramente deduzidas a partir da comparação da sua sequência com genes de funções conhecidas. Porém, para se ter certeza do papel que este desempenha, é necessária a análise de seu padrão de expressão temporal e espacial (HOLTORF; GUITTON; RESKI, 2002).

Tecnologias baseadas na genômica têm produzido enormes quantidades de informações sobre as sequências de DNA, as quais, juntamente com a transformação de plantas, têm aberto novas oportunidades em análises de genômica funcional. Os métodos mais utilizados para a descoberta da função de genes têm empregado a introdução destes em plantas, sendo geralmente utilizadas duas estratégias, que envolvem a superexpressão e o silenciamento. Quando um gene é superexpresso, sua expressão é aumentada, ou seja, é superior ao que

ocorreria normalmente. Já no silenciamento, o gene tem sua expressão suprimida total ou parcialmente (PINHEIRO; GERHARDT; MARGIS, 2000). Assim, a expressão do gene ou sua ausência, pode ser correlacionada à sua função através de análises fenotípicas das plantas (CURTIS; GROSSNIKLAUS, 2003).

Atualmente, além de auxiliar estudos de fisiologia, elucidando, por exemplo, aspectos envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal e como as plantas respondem a mudanças em seu ambiente, a genômica funcional está focada também na busca por genes que possam ser usados para a obtenção de plantas, animais e micro-organismos transgênicos com características específicas superiores.

Os fenótipos de interesse comercial para espécies floresrais incluem: aumento na produtividade, uso na fitorremediação, tolerância a estresses bióticos e abióticos e redução no conteúdo de lignina (JHANSI RANI; USHA, 2013; HÄGGMAN et al., 2013).

## 2.2 ISOLAMENTO DE GENES E PROMOTORES ESPECÍFICOS

Os genes têm sua expressão modulada, entre vários fatores, por promotores, que são sequências de DNA localizadas anteriormente à sequência codificadora, as quais contêm sítios específicos para proteínas iniciadoras e reguladoras da transcrição (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Os promotores podem ser classificados em 4 grupos: constitutivos, induzíveis, sintéticos e específicos. Os promotores constitutivos conduzem a uma expressão em todos os tecidos da planta e durante todo seu ciclo de vida. Geralmente são provenientes de vírus causadores de doenças em plantas ou genes constitutivos, sendo o CAMV35S, o vírus do mosaico da couve-flor, o mais utilizado. (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

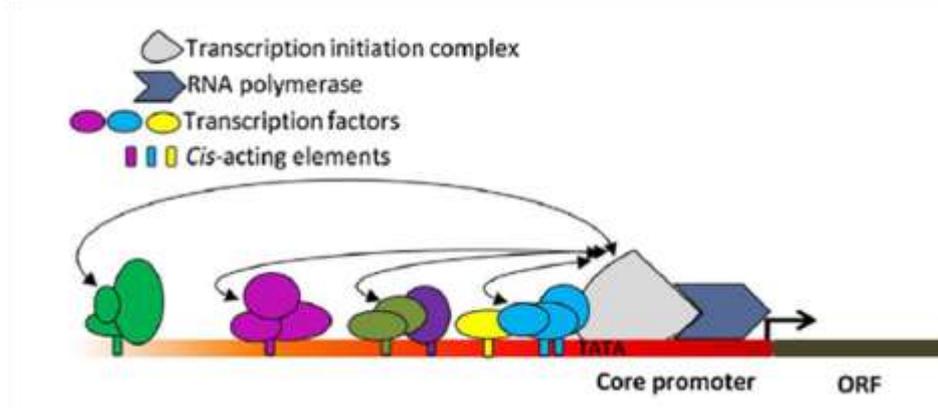
Diferentemente, os induzíveis modulam a expressão dos genes em resposta a sinais endógenos e estímulos externos físicos ou químicos, sendo úteis na regulação da expressão de genes potencialmente letais ou responsivos a estresses bióticos e abióticos. Existem também aqueles que combinam diferentes regiões promotoras podendo assim promover perfis de expressão que não ocorrem na natureza. Estes são conhecidos como promotores sintéticos, e devido às diversas combinações que podem ser formadas, aumentam o número de promotores úteis em estudos (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Além destes, existem ainda os promotores específicos, os quais conduzem a uma expressão mais controlada, restrita a determinadas células, tecidos, órgãos ou estágios de desenvolvimento. Um promotor específico ideal conduzirá a expressão do gene apenas nos tecidos devidos sem afetar os demais (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

No promotor estão presentes a região *core* (que inclui a sequência conservada *TATA box*) e elementos *cis* regulatórios os quais podem ser divididos em: *enhancers*, *silencers* e *insulators*. O *core* do promotor é a sequência mínima necessária para dar início à transcrição, o qual contém o sítio de ligação para a RNA polimerase II (BUTLER; KADONAGA, 2002). Os *enhancers* são elementos que promovem a expressão do gene, enquanto os *silencers* a inibem. Por sua vez, os *insulators* protegem os genes de sinais inapropriados que ocorrem no ambiente, como por exemplo, bloqueando a ação de *enhancers*, *silencers* e a condensação da cromatina, que ocasionaria o silenciamento do gene (WEST; GASZNER; FELSENFELD, 2002).

Estes elementos estão localizados na região *upstream* à região codificante, e compreendem sítios de ligação para fatores de transcrição e/ou outras moléculas de regulação, necessárias para ativar e regular a transcrição (FIGURA 1) (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

FIGURA 1 - REGIÕES PRINCIPAIS DE UM PROMOTOR DE GENE



FONTE: Adaptado de Hernandez-Garcia e Finer (2014).

No estudo do perfil da atividade de promotores, estes são frequentemente fusionados a genes repórteres e introduzidos no genoma vegetal, para posterior regeneração da planta transformada e visualização da expressão destes genes. Em alguns casos é encontrada uma expressão diferencial em plantas transgênicas

quando comparada à atividade nativa do promotor, o que pode ocorrer devido à perda de elementos *cis* essenciais durante sua clonagem (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014; WITTKOPP; KALAY, 2012). Por exemplo, a forte expressão induzida pelo promotor CAMV35S, que ocorre devido a efeitos aditivos causados por elementos tecido-específicos e, mutações em elementos neste promotor, como demonstrado por Lam et al. (1989), ocasionam a perda da expressão em certos tecidos.

Além disso, outros fatores relacionados à expressão devem ser levados em consideração: a falta de determinados fatores de transcrição, que podem alterar o padrão de expressão do gene; a integração aleatória no genoma pode causar variabilidade na expressão, decorrente da sua posição, e ainda o número de cópias inseridas, que pode ocasionalmente induzir a um aumento na expressão ou silenciamento do gene (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Tratando-se dos padrões de expressão de genes nas plantas, os que são controlados por promotores constitutivos, denominados *housekeeping*, são expressos o tempo todo e em todas as células, pois são necessários para funções celulares básicas (HELDT, PIECHULLA, 2005; CHRISPPEELS, 2003).

Diferentemente, aqueles que são controlados por promotores específicos, apresentam expressão restrita, codificando proteínas em determinados órgãos como folhas, caules, raízes e flores, ou tecidos como epidérmicos e vasculares. Além destes, os genes ainda podem ser induzidos ou reprimidos em resposta a condições ambientais: luminosidade, água, nutrientes, altas e baixas temperaturas, patógenos e compostos químicos (SHINMYO; KAWAOKA; INTAPRUK, 1994).

Promotores que dirigem a expressão de genes a tecidos específicos podem ser utilizados para alterar o padrão de expressão de genes de outros organismos conforme o objetivo desejado. É mais indicado o uso de promotores isolados da planta receptora para coordenar a expressão em tecidos específicos, para que o padrão de expressão tenha maior probabilidade de ocorrer de maneira adequada (MURPHY, 2011).

Já foram descritos em literatura alguns casos em que genes que codificam fatores de transcrição responsivos a estresses, foram introduzidos em plantas sob controle de promotores constitutivos e causaram efeitos prejudiciais: *dreb1a*, *stz/zat10* (SALT TOLERANCE ZINC FINGER) e *wxp1* (WAX PRODUCTION 1) (PETOLINO; DAVIES, 2013). No caso do fator de transcrição DREB1a, quando

introduzido em *Arabidopsis* (GILMOUR et al., 2000) tomate (HSIEH et al., 2002) e tabaco (KASUGA et al., 2004) conferiu um aumento na tolerância à seca, porém em todos os casos as plantas apresentaram fenótipo anão.

Portanto, deve-se levar em consideração que os promotores constitutivos são úteis apenas quando são desejados altos níveis de expressão do transgene e de maneira contínua durante todo o ciclo de vida da planta. Este padrão de expressão pode ser desnecessário e até mesmo prejudicial, como por exemplo, quando introduzidos genes de defesa e que conferem tolerância a estresses, pois podem ocasionar fenótipos indesejáveis, incluindo crescimento e desenvolvimento alterado, ativação de vias de defesa sem necessidade, morfologia anormal e gasto metabólico (GURR; RUSHTON, 2005).

O uso de promotores específicos de raiz é de grande interesse, pois podem ser aplicados a diversas finalidades incluindo a biorremediação de solos contaminados, proteção contra a seca, aumento da tolerância à sais, absorção de macro e microelementos e no aumento da resistência à patógenos de raízes (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004).

Em um estudo realizado por Xiao et al. (2006) foram isolados os promotores dos genes *mtpt1* e *mtpt* de *Medicago truncatula* (codificadores de proteínas transportadoras de fosfato) que foram ligados aos genes repórteres *gus* e *gfp*. A expressão dos transgenes em *Arabidopsis thaliana*, demonstrou que os dois promotores são raiz-específicos e induzidos por fósforo, mas levam a diferentes padrões de expressão nos tecidos das raízes. O padrão de expressão foi similar à planta nativa demonstrando que os promotores utilizados contêm todos os elementos conservados.

Em experimentos desempenhados por Li et al. (2013) foram isolados e caracterizados dois promotores de genes de arroz ainda não descritos. Análises de PCR em tempo real identificaram altos níveis de expressão dos genes *os03g01700* e *os02g37190* em tecidos da raiz. Então, para validar os promotores, a atividade destes foi avaliada em plantas de arroz transgênicas utilizando o gene repórter *gus*. Nos resultados encontrados pelos autores, foi observado que os dois promotores conduziram a uma expressão raiz-específica, fornecendo alternativas úteis para a transformação genética visando expressão restrita à raiz em arroz e outros cereais.

No que diz respeito a espécies florestais, alguns promotores raiz-específicos já foram isolados e caracterizados. Liu e Ekramoddoullah (2003) isolaram o promotor

PmPR10-1.14 do gene *pr10* de *Pinus monticola*. As proteínas codificadas por este gene são ativadas em ataques por patógenos e estresse abióticos. Nesse estudo, a atividade do promotor foi avaliada em *Nicotiana tabacum* utilizando o gene *gus*, o qual dirigiu uma expressão raiz-específica nesta espécie. Em outro trabalho, Filichkin et al. (2006) isolaram o promotor ET304 do híbrido *Populus tremula x Populus alba* e caracterizaram seu padrão de expressão em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* e *Populus*. Através do ensaio histoquímico do gene *gus* foi observada sua expressão predominante em raízes.

Outros promotores raiz-específicos já foram descritos em literatura: TobRB7 do tabaco (YAMAMOTO et al., 1991), Pyk10 de *Arabidopsis thaliana* (NITZ et al., 2001), GmTIP da soja (CHEN et al., 2015), FaRB7 do morango (VAUGHAN et al., 2006), dentre outros.

Por fim, além das vantagens descritas, promotores específicos podem ainda ajudar a solucionar questões relacionadas a organismos transgênicos como, por exemplo, efeitos antigênicos, transferência de genes a espécies selvagens próximas e efeitos tóxicos em outras espécies não alvo, pelo fato de dirigir a expressão do transgene de forma controlada (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004).

### 2.3 VALIDAÇÃO DE GENES EM PLANTAS MODELO

Após o isolamento de promotores e genes, antes que os mesmos possam ser utilizados para a transformação de plantas de interesse agrônomico para a obtenção das características desejadas, é necessário que se faça a validação de sua função. Esta validação visa diminuir os gastos e tempo investidos na obtenção de plantas com características desejadas e através desta, é possível entender a regulação de genes durante o desenvolvimento da planta, sua modulação em relação às condições ambientais e também as funções das proteínas codificadas por estes (PINHEIRO; GERHARDT; MARGIS, 2000).

A transformação genética de plantas e posterior regeneração têm se tornado essenciais na descoberta de genes e caracterização de suas funções (BUSOV et al., 2005). Primeiramente, o gene responsável pela característica desejada deve ser identificado, em seguida sua função é validada, para então ser utilizado comercialmente.

Ainda não é possível transformar geneticamente muitas espécies importantes economicamente, então plantas modelo são amplamente utilizadas em estudos de transgenia (TOPPING, 1998). Organismos modelo são espécies amplamente estudadas visando a elucidação de fenômenos biológicos particulares, com a expectativa de que as descobertas auxiliem a compreensão destes fenômenos em outros organismos (DELATORRE; SILVA, 2008).

As informações obtidas através de estudos nestes indivíduos, juntamente com dados de genômica funcional de outras espécies vegetais, podem ser utilizadas na identificação de genes candidatos em bancos de dados e posterior modificação genética de características específicas (STRAUSS; BRUNNER, 2004). Isto só se tornou possível devido ao alto grau de conservação de genes entre espécies durante a evolução (BORÉM; VIEIRA 2005).

Para se enquadrarem como sistemas modelo, as plantas escolhidas devem apresentar facilidade para transformação genética, regeneração e ciclo de vida curto (ZHU, 2001). Dentre os sistemas modelo extensivamente utilizados destacam-se *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*) e os gêneros *Nicotiana* e *Populus*.

Quando utilizadas na cultura de tecidos e em estudos com células, plantas de *Nicotiana tabacum* demonstraram ser altamente versáteis para todos os aspectos. Através do uso de espécies de tabaco foram obtidas, entre o período de 1975 a 1985, as primeiras plantas transgênicas, compreendendo um fato extremamente marcante para a pesquisa. O gênero então passou a ser amplamente empregado no desenvolvimento de técnicas de transformação e engenharia genética, sendo o mais utilizado no século 20 (GANAPATHI et al., 2004; GEBHARDT, 2016).

Estes acontecimentos só se tornaram possíveis, pois estas espécies apresentam características como alta diversidade fenotípica, excelente resposta no cultivo *in vitro* e rápido crescimento (ciclo de vida em torno de 3 meses) (KOLE, 2010; GANAPATHI et al., 2004). No entanto, sua distância evolutiva com relação a espécies lenhosas, fez com que se buscassem alternativas como plantas modelo, como por exemplo, espécies de *Populus*.

O gênero *Populus* passou a ser utilizado como modelo para espécies perenes lenhosas, devido à necessidade de organismos que melhor representassem características específicas da biologia das árvores (STOBRAWA, 2014). Exemplos destas características são a formação da madeira e sazonalidade, além disso,

estudos relacionados ao controle do florescimento, interações bióticas e evolução de características adaptativas são enriquecidos com a adoção de *Populus* como sistema modelo (JANSSON; DOUGLAS, 2007).

Bradshaw et al. (2000) descreveram algumas propriedades que reforçam a determinação do gênero *Populus* como modelo: variação genética em populações naturais, facilidade de propagação sexual e hibridização interespecífica, respostas fisiológicas a variáveis ambientais rápidas e nítidas, modelos de processos fisiológicos para o crescimento e desenvolvimento (bases de dados de características anatômicas, fisiológicas e silviculturais são disponíveis para um número razoável de espécies) facilidade na propagação vegetativa, transformação genética e regeneração.

Diversos relatos já foram publicados demonstrando o uso de espécies de *Nicotiana* e *Populus*, comprovando a eficiência e facilidade de manipulação destes organismos em estudos de transgenia.

Li et al. (2011) estudaram a resistência a seca em tabacos superexpressando o gene *taexpb23* isolado de coleótilos de trigo. Este gene codifica uma expansina, proteína responsável pelo alongamento celular, que acredita-se ser afetada devido à falta de água, reduzindo assim o crescimento e produtividade da planta. Como resultado, os autores observaram que as plantas transgênicas foram menos afetadas pelo estresse hídrico do que as plantas não transformadas.

Em outro estudo utilizando tabaco, Cao et al. (2006) superexpressaram o gene *osbierf3* de arroz, o qual codifica uma proteína que pertence à família de fatores de transcrição EREBP, que se liga ao DNA em resposta ao etileno, levando à ativação de genes que codificam proteínas PR (pathogenesis-related). Os autores objetivaram o entendimento da função deste gene na resistência a doenças e estresses abióticos e através da superexpressão em *Nicotiana tabacum*, observaram um aumento na resistência a patógenos virais e bacterianos e aumento na tolerância a estresse salino.

Com relação ao *Populus*, os estudos de transformação genética tiveram início em 1987 por Fillatti et al. compreendendo a primeira espécie florestal transformada. Espécies deste gênero são muito utilizadas na genômica funcional devido a possibilidade de transformação genética, regeneração, propagação vegetativa e rápido crescimento (ZHUANG et al., 2008).

Diversos experimentos já foram realizados visando o entendimento da via biossintética da lignina utilizando *Populus*. Através da tecnologia antisense, Baucher et al. (1996) reduziram a atividade da enzima CAD em *Populus tremula x Populus alba* em aproximadamente 70%. Esta enzima catalisa o último passo de síntese de precursores de lignina, e, apesar de não ter sido observada redução em seu conteúdo, a composição da lignina foi alterada tornando sua remoção mais fácil. Em experimentos posteriores, Li et al. (2003) e Caihong et al. (2004) suprimiram outra enzima chave desta rota, a 4CL e ambos obtiveram redução no conteúdo de lignina em torno de 40%.

Weigel e Nilsson (1995) produziram plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* e *Populus tremula x Populus tremuloides* superexpressando o gene *leafy*, envolvido na iniciação do florescimento em *Arabidopsis*. Como resultado, o tempo necessário para florescimento, que normalmente ocorre entre 8-20 anos, foi reduzido para 7 meses em *Populus*. Os autores citam o uso da indução do florescimento no desenvolvimento de estratégias envolvendo o controle deste processo em espécies economicamente importantes.

Outro exemplo de estudo conduzido em *Populus* foi realizado por Eriksson et al. (2000) no qual o gene da GA 20-oxidase (enzima da rota biossintética de giberelina) foi superexpresso. O aumento na expressão deste gene resultou em árvores com crescimento mais rápido em altura e diâmetro, folhas mais largas, número superior de fibras do xilema e aumento na biomassa. Os resultados obtidos pelos autores demonstram a possibilidade de aplicação da modificação nos níveis de giberelina objetivando-se a alteração de características importantes para indústrias de polpa e papel.

## 2.4 ORGANOGÊNESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS

A cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais são utilizados meios de cultivo nutritivos, objetivando-se o crescimento e multiplicação de células, tecidos e órgãos sob condições assépticas em ambiente controlado (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006). O cultivo *in vitro* de explantes pode ser utilizado para diversas finalidades, podendo-se citar: o estudo e entendimento de fatores responsáveis pela morfogênese e desenvolvimento da planta, micropropagação de espécies desejadas, produção de metabólitos

secundários, obtenção de plantas livres de doenças, conservação de germoplasma e regeneração de plantas transgênicas (RAZDAN, 2003).

A transformação genética, segundo Torres et al. (2000), é definida como a transferência de genes para o genoma de um organismo vivo de maneira controlada, através de via não sexual. Esta técnica permite a introdução de genes de interesse, a produção de fármacos, alimentos mais nutritivos, espécies vegetais mais produtivas, dentre outras características, originando um organismo geneticamente modificado (OGM).

A engenharia genética passou a ser utilizada como ferramenta aliada ao melhoramento genético convencional, permitindo a superação de algumas limitações como a troca de genes apenas entre espécies sexualmente compatíveis e transferência de genes indesejáveis, conseqüentemente, reduzindo o período necessário para obtenção de novas cultivares (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

O método mais utilizado para a transferência de genes consiste no uso da bactéria de solo gram-negativa *Agrobacterium tumefaciens*, a qual apresenta a capacidade natural de transferir genes para a célula vegetal e devido a isso, passou a ser utilizada em experimentos de transgenia (DE LA RIVA et al., 1998). O processo de infecção tem início com a interação entre a bactéria e a planta, devido a produção de compostos fenólicos pelo tecido vegetal, como resposta a um ferimento. A bactéria é então atraída por essas moléculas sinalizadoras e passa a sintetizar filamentos de celulose que permitem sua fixação à célula hospedeira, realizando em seguida a transferência do T-DNA (ANDRADE; SARTORETTO; BRASILEIRO, 2003).

Na região do T-DNA são inseridos além dos genes de interesse, genes marcadores de seleção e repórteres. Os genes marcadores conferem à planta resistência a antibióticos ou herbicidas, permitindo assim apenas a sobrevivência destas e conseqüentemente a morte das plantas não transformadas. A capacidade de sobrevivência geralmente ocorre devido a codificação de uma proteína com atividade enzimática (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Um dos genes de seleção mais utilizados é o gene da neomicina fosfotransferase (*nptII*), que confere resistência aos antibióticos canamicina e geneticina. Outro exemplo de gene marcador é o da higromicina fosfotransferase (*hpt*), que confere resistência ao antibiótico higromicina, que, pelo fato de ser mais

tóxico do que a canamicina, pode ser utilizado em concentrações menores (CANHOTO, 2010).

Se tratando dos genes repórteres, estes são utilizados para que as plantas transformadas sejam identificadas a partir de um fenótipo diferente. Dois genes repórteres amplamente utilizados são *gus* e *gfp*. O gene *gus* codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase a qual na presença do substrato X-Gluc produz um precipitado azul, sendo assim possível a visualização da expressão do gene através de um ensaio histoquímico. Diferentemente, o gene *gfp* codifica uma proteína verde fluorescente que pode ser visualizada através da irradiação de luz UV de onda longa (ZIEMIENOWICZ, 2001).

Após a transformação genética é necessária a regeneração de plantas contendo o DNA de interesse. É importante ressaltar que durante a transformação de explantes vegetais, apenas um pequeno número de células recebe e integra de maneira estável o transgene, sendo, portanto essencial o desenvolvimento de protocolos de regeneração eficientes para possibilitar o sucesso na obtenção de plantas transgênicas (BIRCH, 1997).

A regeneração de órgãos *in vitro*, pode ocorrer através da via organogênica, na qual, primeiramente as células sofrem desdiferenciação, respondendo a reguladores vegetais e adquirindo competência organogênica. Posteriormente, entram novamente em ciclo celular e após os destinos celulares serem determinados, se diferenciam e dão origem ao novo órgão (ZHAO et al., 2008).

A formação de brotos ou raízes a partir do tecido do explante ocorre de forma direta ou indireta. Quando acontece diretamente, sem passar pela fase de calo, compreende a organogênese direta. Já na via indireta, antes dos órgãos, ocorre a formação de uma massa indiferenciada denominada calo. A capacidade das células vegetais de proliferarem e se diferenciarem, denominada totipotência, torna possível a obtenção de indivíduos inteiros através de uma única célula. A eficiência desta regeneração pode variar de acordo com os componentes nutricionais presentes no meio de cultura utilizado, reguladores de crescimento e as condições ambientes oferecidas (NHUT; TEIXEIRA DA SILVA; ASWATH, 2003; GIRI et al., 2004).

## 2.5 ORGANOGÊNESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus* A PARTIR DE RAÍZES

O sucesso na transformação genética e posterior regeneração de plantas é dependente de muitos fatores, como por exemplo o tipo de explante utilizado. Podem ser utilizadas diferentes partes da planta como folhas, raízes, gemas, sementes, embriões, protoplastos, dentre outros (CARVALHO; VIDAL, 2003). O uso de raízes apresenta características vantajosas quando comparado a outros explantes devido à alta capacidade regenerativa, fácil manipulação, menor oxidação e também alta suscetibilidade à *Agrobacterium tumefaciens* (MÁRTON; BROWSE 1991; SHARMA, 2012).

Para *Populus* o uso de raízes na organogênese foi demonstrado para dois clones do híbrido *Populus alba* x *Populus grandidentata* por Son e Hall (1990). Nesse estudo, foi avaliada a influência de diferentes concentrações, que variaram entre 0,05 a 50  $\mu\text{M}$ , dos reguladores de crescimento benzilaminopurina (BAP), cinetina, isopenteniladenina (2iP) e zeatina, adicionados em meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981). Como resultado, os autores obtiveram alta regeneração de brotos, um número médio de aproximadamente 100 brotos por segmento de 8-10 cm, utilizando a zeatina nas concentrações de 14 e 22  $\mu\text{M}$ . Foi observada também uma taxa de sobrevivência no solo das plantas aclimatadas superior a 98%. Os dados obtidos demonstram a possibilidade de aplicação de raízes em estudos de transformação genética, criopreservação e variação somaclonal em espécies lenhosas.

Tsvetkov, Hausman e Jouve (2007) descreveram um protocolo de regeneração para *Populus alba*, também a partir de raízes, cultivadas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), no qual foram testadas 5 concentrações de TDZ (0,02; 0,11; 0,56; 2,8 e 14,1  $\mu\text{M}$ ). A citocinina TDZ foi eficiente na indução de brotos nas concentrações mais baixas, que variaram entre 0,02 a 0,56  $\mu\text{M}$ . Foi obtida uma média superior a 6 brotos por explante de 1,0-1,5 cm. Os autores concluíram que com este protocolo é possível utilizar com sucesso segmentos de raízes de *Populus alba* como explantes iniciais na organogênese direta *in vitro*.

Outros autores descreveram o uso de raízes como explantes para organogênese de *Populus*. Chaturvedi et al. (2004) avaliaram a influência de BAP, 2iP, cinetina e zeatina em concentrações que variaram de aproximadamente 0,4 a

4,5  $\mu\text{M}$ , juntamente com 1,4  $\mu\text{M}$  de AIA, adicionados ao meio MS líquido, na organogênese a partir de raízes de *Populus deltoides* e obtiveram 7,8 brotos por segmento utilizando 1,1  $\mu\text{M}$  de BAP. Sherif e Khattab (2011) estudaram a influência do TDZ em concentrações que variaram de 0,005 a 0,08  $\mu\text{M}$ , adicionado ao meio MS para a organogênese de *P. alba*, *P. tremula* e *P. tremula* x *P. tremuloides*, obtendo-se até 39,3 brotos por segmento de raíz (1,0-15 cm) com o uso de 0,01  $\mu\text{M}$ , o que variou de acordo com a espécie utilizada.

Vinocur et al. (2000) testaram diferentes concentrações de BAP (0,44, 0,89 e 1,78  $\mu\text{M}$ ) e TDZ (0,0045, 0,045 e 0,45  $\mu\text{M}$ ) adicionados ao meio MS líquido, na organogênese de *Populus tremula* e obtiveram em torno de 42 gemas por segmento (1,5-2,0 cm) utilizando 0,045  $\mu\text{M}$  de TDZ. Yadav et al. (2009) estudaram a organogênese a partir de raízes de *Populus deltoides* em meio MS líquido suplementado com diferentes concentrações (0,046 a 4,65  $\mu\text{M}$ ) de cinetina e 1,4  $\mu\text{M}$  AIA, obtendo-se até 45% de resposta organogênica das raízes com 1,16  $\mu\text{M}$ .

Após a obtenção de um protocolo de organogênese a sua eficiência na regeneração de plantas transformadas deve ser avaliada através de experimentos de transformação genética. Desta forma, também é importante a otimização de protocolos de transformação genética (ASHRAF et al., 2012)

Diversos protocolos de transformação genética para *Populus* estão disponíveis na literatura com eficiências de transformação que variam de acordo com a espécie, clone e tipos de explantes utilizados.

Leplé et al. (1992) desenvolveram um protocolo para *P. tremula* x *P. alba* utilizando folhas e segmentos internodais como explantes e obtiveram uma eficiência de transformação de até 88,2%; Ma, Strauss e Meilan (2004) descreveram um protocolo de transformação para *P. trichocarpa* utilizando discos foliares e segmentos internodais atingindo uma eficiência de transformação de 6%; Filichkin et al. (2006) transformaram geneticamente o híbrido *P. tremula* x *P. alba* utilizando segmentos internodais e discos foliares, obtendo uma eficiência de transformação em torno de 60%; Song et al. (2006) descreveram um protocolo de transformação genética para *P. trichocarpa* utilizando segmentos internodais como explantes alcançando até 40% de transformação no sistema mais eficiente e John, Maqbool e Malik (2014), utilizaram como explantes folhas e segmentos internodais de *P. deltoides*, obtendo uma eficiência geral de transformação de 10,95%. Porém, não

foram encontrados na literatura protocolos de transformação genética de espécies de *Populus* utilizando raízes como explantes.

## REFERÊNCIAS

- ABDEEVA, I; ABDEEV, R. Transgenic Plants as a Tool for Plant Functional Genomics. In: ÇİFTÇİ, Y. O. **Transgenic Plants - Advances and Limitations**. Intech, 2016. p. 259-284.
- ANDRADE, G. M. DE; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 5. p. 465–476. 2003.
- BAUCHER, M. et al. Red Xylem and Higher Lignin Extractability by Down-Regulating a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Poplar. **Plant physiology**, v. 112, n. 4, p. 1479–1490. 1996.
- BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. In: \_\_\_\_\_. **Melhoramento de Plantas**. 2007. Disponível em [www.bespa.agrarias.ufpr.br](http://www.bespa.agrarias.ufpr.br)., p.1-9.
- BIRCH, R. G. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297–326. 1997.
- BOERJAN, W. Biotechnology and the domestication of forest trees. **Current Opinion in Biotechnology**. n. 16. p. 159-166. 2005.
- BORÉM, A.; VIEIRA, M. L. C. **Glossário de biotecnologia**. Viçosa, UFV, 2005. 380 p.
- BRADSHAW, H. et al. Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. **Journal of Plant Growth Regulator**, v. 19, n. 3, p. 306–313. 2000.
- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/CNPH, 1999. v.2. p.679-735.
- BUSOV, V. B. et al. Genetic transformation: A powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. **New Phytologist**, v. 167, p. 9–18. 2005.
- BUTLER, J. E. F.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, v. 16, n. 20, p. 2583–2592. 2002.
- CAIHONG, J. et al. Obtaining the transgenic poplars with low lignin content through down-regulation of 4CL. **Chinese Science Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 905–909. 2004.
- CANHOTO, M., J. Biotecnologia vegetal da clonagem de plantas à transformação genética. In: \_\_\_\_\_. **Transformação Genética De Plantas**. Imprensa da Universidade de Coimbra. 2010. p. 253-303.

CAO, Y. et al. Overexpression of the rice EREBP-like gene OsBIERF3 enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67, n. 3–5, p. 202–211. 2006.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. Embrapa Algodão. p. 1-42. 2003.

CHATURVEDI, H. C. et al. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through in vitro regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 203-208. 2004.

CHEN, L. et al. The characterization of GmTIP, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 259-274. 2015.

CHRISPEELS, M. The Genetic Basis of Growth and Development. In:CHRISPEELS, M; SADAVA, D. **Plants, Genes and Crop Biotechnology**. Jones & Bartlett Learning, 2003. p.182-210.

CURTIS, M. D.; GROSSNIKLAUS, U. A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta [w]. **Plant Physiology**, v. 133, p. 464–469. 2003.

DE LA RIVA, G. A. et al. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. **EJB Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3. 1998.

DE LA TORRE, F. et al. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular-specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 1, p. 77–84. 2014.

DELATORRE, C. A.; SILVA, A. A. *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, p. 58–67. 2008.

ERIKSSON, M. E. et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 784–788. 2000.

FILICHKIN, S. A. et al. Enhancer trapping in woody plants: Isolation of the ET304 gene encoding a putative AT-hook motif transcription factor and characterization of the expression patterns conferred by its promoter in transgenic *Populus* and *Arabidopsis*. **Plant Science**, v. 171, n. 2, p. 206–216. 2006.

FILLATTI, J. J. et al. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 206, n. 2, p. 192–199. 1987.

GANAPATHI, T. R. et al. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 171-184. 2004.

GEBHARDT, C. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, p. 2281–2294. 2016.

GILMOUR, S. J. et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. **Plant physiology**, v. 124, p. 1854–1865. 2000.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: An overview. **Trees**, v. 18, n. 2, p. 115–135. 2004.

GURR, S. J.; RUSHTON, P. J. Engineering plants with increased disease resistance: What are we going to express? **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 275-282. 2005.

HÄGGMAN, H. et al. Genetically engineered trees for plantation forests: Key considerations for environmental risk assessment. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 785–798. 2013.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119. 2014.

HELDT, H. W. PIECHULLA, B. **Plant Biochemistry**. Academic Press, 2005. p. 656.

HSIEH, T. et al. Heterology Expression of the *Arabidopsis* C-Repeat / Dehydration Response Element Binding Factor 1 Gene Confers Elevated Tolerance to Chilling and Oxidative Stresses in Transgenic Tomato. **Plant physiology**, v. 129, n. July, p. 1086–1094. 2002.

HOLTORF, H.; GUITTON, M. C.; RESKI, R. Plant functional genomics. **Plant Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 235–49. 2002.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **Agricultural Biotechnology: A Lot More Than Just GM Crops**. 2014. 40 p. Disponível em:

<[http://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural\\_biotechnology/download/Agricultural\\_Biotechnology.pdf](http://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural_biotechnology/download/Agricultural_Biotechnology.pdf)>. Acesso em: 4 janeiro 2017.

JANSSON, S.; DOUGLAS, C. J. *Populus*: A Model System for Plant Biology. **Annu Rev Plant Biol**, v. 58, p. 435–458. 2007.

JOHN, E.; MAQBOOL, A.; MALIK, K. A. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation in *Populus deltoides*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 3, p. 1079–1086. 2014.

JHANSI RANI, S.; USHA, R. Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 8, p. 879–883. 2013.

KASUGA, M. et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 3, p. 346–350. 2004.

KOLE, C. et al. Transgenic crop plants. **Transgenic Crop Plants**, v. 1, p. 1–315. 2010.

LAM, E. et al. Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 7890–7894. 1989.

LEPLE, J. C. et al. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 137–141. 1992.

LI, F. et al. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene TaEXPB23 in transgenic tobacco. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 9, p. 960–966. 2011.

LI, L. et al. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4939–4944. 2003.

LI, Y. et al. Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 207, p. 37–44. 2013.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 103–120. 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327. 1981.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. An Introduction to Plant Cell Culture. In: \_\_\_\_\_. **Plant Cell Culture Protocols**. Totowa: Humana Press Inc, 2006. p. 3-9.

LU, H.C. et al. Strategies for Functional Validation of Genes Involved in Reproductive Stages of Orchids. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 558–569. 2007.

MA, C.; STRAUSS, S. H.; MEILAN, R. Agrobacterium-mediated transformation of the genome-sequenced poplar clone, nisqually-1 (*Populus trichocarpa*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 3, p. 311–312. 2004.

MACQUEEN, A.; BERGELSON, J. Modulation of R-gene expression across environments. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 7, p. 2093–2105. 2016.

MÁRTON, L; BROWSE, J. Facile transformation of *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 10, n.5, p.235-239. 1991.

MEI – MOBILIZAÇÃO EMPRESARIAL PELA INOVAÇÃO. **Innovation is action. 22 Innovation business cases of small, medium and large companies**. Brasília. 2015. 334 p. Disponível em: <[https://static-cms-si.s3.amazonaws.com/media/filer\\_public/57/25/5725daa1-2c3e-4ce8-98c9-299a0c184d62/book\\_en\\_web.pdf](https://static-cms-si.s3.amazonaws.com/media/filer_public/57/25/5725daa1-2c3e-4ce8-98c9-299a0c184d62/book_en_web.pdf)>. Acesso em: 5 março 2017.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**. p. 473-479. 1962.

MURPHY, D. **Plants, Biotechnology & Agriculture**. CABI, 2011. p. 310.

NITZ, I. et al. Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 161, n. 2, p. 337–346. 2001.

PETOLINO, J. F.; DAVIES, J. P. Designed transcriptional regulators for trait development. **Plant Science**, v. 201–202, n. 1, p. 128–136. 2013.

PINHEIRO, M. M.; GERHARDT, L.; MARGIS, R. Uma tecnologia com múltiplas aplicações. **História, Ciências, Saúde — Manguinhos**. v. 7, n. 2, p. 465-479. 2000.

PORTH, I.; EL-KASSABY, Y. Current status of the development of genetically modified (GM) forest trees world-wide: a comparison with the development of other GM plants in agriculture. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 9, n. 8, p. 1–12. 2014.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 1–22. 2004.

RASHID, B.; HUSNAIN, T. RIAZUDDIN, S. Plant Genetic Engineering: Problems and Applications. In: ASHRAF et al. **Crop Production for Agricultural Improvement**. Springer Science & Business Media, 2012. p. 263-291.

RAZDAN, M. K. Introductory History. In: RAZDAN, M. K. **Introduction to Plant Tissue Culture**. Science Publishers, 2003. p. 3-14.

SHARMA, V. Regenerative Competence in root explants of *Cattleya* hybrid, an endangered genera: A study in vitro. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, n. 12, p. 2011–2013. 2012.

SHERIF, F. EL; KHATTAB, S. Direct shoot regeneration from leaf, root and stem internode segments of male poplar trees and the molecular analysis of variant regenerated plants. **Journal of American Science**, v. 7, n. 8, p. 200–206. 2011.

SHINMYO, A.; KAWAOKA, A.; INTAPRUK, C. Gene Regulation in Plant Cells In: RYU, D.D.Y; FURUSAKI, S. **Advances in Plant Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.11-21.

SONG, J. et al. Genetic transformation of *Populus trichocarpa* genotype Nisqually-1: A functional genomic tool for woody plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 11, p. 1582–1589. 2006.

STOBRAWA, K. Poplars (*Populus* spp.): Ecological role, applications and scientific perspectives in the 21st century (Review paper). **Baltic Forestry**, v. 20, n.1, p. 204-213. 2014.

STRAUSS, S. H.; BRUNNER, A. M. Tree biotechnology in the 21st century: Transforming trees in the light of comparative genomics. In: STRAUSS, S. H.; BRADSHAW, H. D. **The BioEngineered Forest: Challenges to Science and Society**. Washington: Routledge, 2004. p. 76-97.

TORRES et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPq, 2000. p. 128.

TSVETKOV, I.; HAUSMAN, J.; JOUVE, L. Thidiazuron-induced Regeneration in Root Segments of White Poplar (*P. alba* L.). **In Vitro**, v. 13, n. 2016, p. 623–626. 2007.

United Nations. **World Population Prospects - The 2015 REVISION**. Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2015. Disponível em: <[https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key\\_findings\\_wpp\\_2015.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf)>. Acesso em: 24 novembro 2016.

VAUGHAN, S. P. et al. Characterization of FaRB7, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3901–3910. 2006.

VINOCUR, B. et al. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1146–1154. 2000.

XIAO, K. et al. Isolation and characterization of root-specific phosphate transporter promoters from *Medicago truncatula*. **Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 439–449. 2006.

WEIGEL, D.; NILSSON, O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. **Nature**, v. 377, p. 495–500. 1995.

WEST, A. G.; GASZNER, M.; FELSENFELD, G. Insulators: many functions, many mechanisms. **Genes & Development**, n. 16, p. 271–288. 2002.

WITTKOPP, P. J.; KALAY, G. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1, p. 59–69. 2012.

YADAV, R. et al. High frequency direct plant regeneration from leaf, internode, and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*). **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, n. 3, p. 175–182. 2009.

YAMAMOTO, Y. T. et al. Characterization of cis-Acting Sequences Regulating Root-Specific Gene Expression in Tobacco. **The Plant Cell**, v. 3, p. 371–382. 1991.

YE, X. et al. Transgenic *Populus* Trees for Forest Products, Bioenergy, and Functional Genomics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 5, p. 415–434. 2011.

ZHAO, X. Y. et al. Cell fate switch during in vitro plant organogenesis. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 7, p. 816–824. 2008.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 66-71. 2001.

ZHUANG, J. et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Populus trichocarpa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, n. 3, p. 468–474. 2008.

ZIEMIENOWICZ, A. Review Plant selectable markers and reporter genes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 23, n. 3, p. 363–374. 2001.

### 3 ORGANOGÊNESE E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 ATRAVÉS DE RAÍZES

#### RESUMO

Apesar de diversos protocolos de organogênese e transformação genética já terem sido publicados para espécies de *Populus*, poucos descrevem o uso de raízes, as quais apresentam diversas vantagens quando comparadas à outros explantes. Devido a isso, neste capítulo foram desenvolvidos protocolos de organogênese e transformação genética de *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 utilizando raízes como explantes. Foram realizados três experimentos de organogênese nos quais foram testados diferentes reguladores vegetais (zeatina, cinetina e BAP) nas concentrações de 2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ , diferentes concentrações de zeatina (7, 14 e 21  $\mu\text{M}$ ) e a influência da idade dos explantes (2 e 6 meses após a última repicagem). Os experimentos foram avaliados aos 30 e 60 dias quanto a porcentagem de explantes responsivos e número de brotos por explante. No experimento de diferentes citocininas, a zeatina e o BAP apresentaram os maiores valores de explantes responsivos, 82,5 e 83,75%, nas concentrações de 8,8 e 2,2  $\mu\text{M}$ , respectivamente, não diferindo estatisticamente. Porém, a zeatina foi escolhida melhor citocinina, pois, com o BAP, os brotos apresentaram morfologia anormal. Quando testadas diferentes concentrações de zeatina, não foi observada diferença estatística na porcentagem de explantes responsivos. No entanto, quanto ao número de brotos, na concentração de 14  $\mu\text{M}$  foi obtido o maior valor, aproximadamente 4 brotos por explante. A idade do explante influenciou na resposta organogênica aos 30 dias, porém aos 60 dias não foi observada diferença estatística. Nos experimentos de transformação genética, foram testados diferentes tempos de ultrassom (30 e 60 s), se a viabilidade da *Agrobacterium* é afetada pelo ultrassom (realizando o ultrassom com ou sem a bactéria) e o co-cultivo em meio líquido ou semissólido. Quanto aos diferentes períodos de ultrassom, ainda não foi avaliada a influência na transformação, pois os brotos não atingiram tamanho suficiente para as análises de biologia molecular. Com relação à viabilidade da *Agrobacterium*, foi observado que a bactéria não sofreu danos letais com o período utilizado. Por fim, quando testados diferentes meios para o co-cultivo, utilizando o semissólido foram obtidos mais eventos do que em meio líquido. Com o uso dos protocolos desenvolvidos neste capítulo, foi realizada com sucesso a transformação genética e regeneração de plantas de *Populus* a partir de raízes.

**Palavras-chave:** Ultrassom. Zeatina. Co-cultivo.

## SHOOT ORGANOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF *Populus tremula* X *Populus alba* CLONE 717-1B4 USING ROOTS

### ABSTRACT

Although several protocols of shoot organogenesis and genetic transformation have already been published for *Populus* species, few describe the use of roots, which shows several advantages when compared to other types of explants. Therefore, in this chapter, were developed protocols for organogenesis and genetic transformation of *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 using roots as explants. Three organogenesis experiments were performed in which were tested different plant regulators (zeatin, kinetin and BA) at concentrations of 2.2, 4.4 e 8.8  $\mu\text{M}$ , different concentrations of zeatin (7, 14 e 21  $\mu\text{M}$ ) and the influence of the age of explants (2 and 6 months old). The experiments were evaluated at 30 and 60 days for the percentage of responsive explants and number of shoots per explant. In the experiment of different cytokinins, zeatin and BA showed the highest values of responsive explants, 82.5 and 83.75%, at 8.8 and 2.2  $\mu\text{M}$ , respectively, didn't differing statistically. However, zeatin was chosen as the best cyokinin, because with BA shoots showed abnormal morphology. Subsequently, when different concentrations of zeatin were tested, no statistical difference was observed in the percentage of responsive explants. However, for the number of shoots, at the concentration of 14  $\mu\text{M}$  the highest value was obtained, approximately 4 shoots per explant. The age of the explant influenced the organogenic response at 30 days, but at 60 days no statistical difference was observed. In the genetic transformation experiments were tested different periods of sonication (30 and 60 s), if the viability of *Agrobacterium* is affected by sonication (performing sonication with or without *Agrobacterium*) and co-cultivation in liquid or semi-solid medium. When tested different sonication periods, the influence on the transformation was not evaluated yet, because the shoots did not reach enough size for molecular biology analyzes. Regarding the viability of *Agrobacterium*, it was observed that the bacterium did not suffer lethal damage with the period used. Finally, when different media were tested for co-cultivation, using the semi-solid, more events were obtained than in liquid co-cultivation. Using the protocols developed in this chapter, genetic transformation and regeneration of *Populus* plants from roots were successfully performed.

**Key-words:** Sonication. Zeatin. Co-cultivation.

## 4 INTRODUÇÃO

O gênero *Populus* é composto por 25 a 35 espécies de plantas decíduas, amplamente distribuídas pelo Hemisfério Norte e utilizadas nas indústrias de polpa e papel, fósforo, madeira folheada e serrada, forragem, móveis e produção de energia (BASSAM, 2010).

Devido a características como rápido crescimento, genoma pequeno, fácil manipulação, suscetibilidade à *Agrobacterium*, juntamente com o sequenciamento do genoma de *Populus trichocarpa*, o gênero passou a ser considerado modelo na engenharia genética para espécies florestais (KIM; KLOPFENSTEIN; CHUN, 1997; KERSTEN et al., 2016). Além disso, espécies de *Populus* têm sido utilizadas no melhor entendimento de fenômenos como a formação do xilema secundário, câmbio vascular e sazonalidade (JANSSON; DOUGLAS, 2007).

As plantas modelo, portanto, compreendem uma alternativa a espécies que apresentam baixa porcentagem de transformação genética, dificuldades na manipulação e regeneração *in vitro*. Em estudos com espécies de *Eucalyptus*, por exemplo, que apresentam recalcitrância à transformação genética, o uso destas plantas na elucidação das funções de genes de interesse e de fenômenos biológicos é de grande valia (BUSOV, 2005).

Com o advento da transgenia tornou-se possível a introdução de genes de qualquer organismo, ultrapassando as barreiras de cruzamento entre os reinos. Após a introdução do DNA exógeno desejado na célula vegetal, é necessária a regeneração de plantas transformadas apresentando a nova característica. Conseqüentemente, a eficiência dos protocolos de organogênese e transformação genética pode ser uma barreira no uso da tecnologia de DNA recombinante (SHARMA; BHATNAGAR-MATHUR; THORPE, 2005)

Vários protocolos de transformação para espécies de *Populus* estão disponíveis. Os meios de cultura mais empregados nos experimentos são MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) com eficiências de transformação que variam entre 10 a 88% (LEPLE et al., 1992; FILICHKIN et al., 2006; SONG et al., 2006; MA; STRAUSS; MEILAN, 2004; JHON; MAQBOOL; MALIK, 2014).

Apesar da disponibilidade de um grande número de protocolos de transformação genética e organogênese para *Populus*, a eficiência é variável entre

espécies e clones, sendo de grande interesse a otimização destes. Um dos fatores que interferem no sucesso da regeneração das plantas transformadas é a escolha do explante adequado, o qual deve apresentar alta capacidade regenerativa.

Os explantes vegetais utilizados com maior frequência para organogênese de *Populus* são foliares (AGGARWAL; SHARMA; SRIVASTAVA, 2012; JIANG; LIU; ZHENG, 2015; THAKUR; SRIVASTAVA, 2006) e segmentos caulinares (BISWAS et al., 2012; MAHESHWARI; KOVALCHUK, 2011; NOIËL; LEPÉ; PILATE, 2002; WANG et al., 2008). Poucos autores descrevem o uso de raízes como explantes, dentre eles pode-se citar: Son e Hall (1990) e Chaturvedi et al. (2004) que avaliaram a influência dos reguladores zeatina, cinetina, 2iP e BAP; Tsvetkov, Hausman e Jouve (2007) e Sherif e Khattab (2011) que testaram o efeito do TDZ; Vinocur et al. (2000) utilizaram BAP e TDZ e Yadav et al. (2009) utilizaram cinetina e AIA.

São descritas algumas vantagens do uso de raízes quando comparadas aos demais explantes como a alta capacidade regenerativa e suscetibilidade à *Agrobacterium tumefaciens* (MÁRTON; BROWSE, 1991). Além disso, Son e Hall (1990) também citam a fácil manipulação e menor oxidação após excisão. Nesse estudo, os autores obtiveram um elevado número de brotos por explante, aproximadamente 100 por segmento para dois clones analisados, utilizando a zeatina nas concentrações de 14 e 22  $\mu\text{M}$ .

Em nossas condições a utilização de protocolos já estabelecidos a partir de explantes foliares não foi eficiente na organogênese e transformação, pois não foram obtidas plantas transgênicas. Portanto, surgiu a necessidade de desenvolver protocolos alternativos. Como não existem relatos de transformação genética de *Populus* utilizando raízes como explantes iniciais, decidimos investigar se seria viável sua utilização na organogênese e transformação para o clone 717-1B4. Desta forma, no presente trabalho, objetivou-se o estabelecimento de protocolos de organogênese e transformação genética para *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 utilizando raízes como explantes.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Cultura de Tecidos e Transformação e Biologia Molecular (CQB 302/10) da Embrapa Florestas - Colombo/PR.

### 5.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

Plantas *in vitro* de *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Gilles Pilate, INRA, França. Para os experimentos de organogênese e transformação genética, foram utilizados como explantes segmentos de raízes de aproximadamente 2 cm cortados com auxílio de bisturi. Nos experimentos de organogênese as raízes foram isoladas de plantas com 2 a 6 meses, desde a última repicagem. Nos experimentos de transformação genética, foram utilizadas como fontes de explantes plantas com 4 e 5 meses, desde a última repicagem. As plantas do clone 717-1B4 foram micropropagadas através de segmentos nodais contendo duas gemas axilares, em frascos com 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro, contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. A formação de raízes ocorre naturalmente no meio de micropropagação. As plantas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25  $\pm$  2°C.

O pH de todos os meios de cultura utilizados foi ajustado para 5,8 e estes foram autoclavados a 120°C e 1 atm durante 20 minutos.

### 5.3 ORGANOGÊNESE A PARTIR DE RAÍZES DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

Em todos os experimentos os explantes foram cultivados em placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro contendo aproximadamente 25 mL de meio basal WPM (Wood Plant Medium – LLOYD; MCCOWN, 1981) suplementado com os reguladores vegetais respectivos para cada experimento, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g

L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. As repicagens foram realizadas a cada 15 dias para placas contendo o mesmo meio de cultura.

Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 5.3.1 Efeito de diferentes citocininas

Foram utilizadas raízes provenientes de plantas com 5 meses desde a última repicagem. Os explantes foram cultivados em placas de Petri com meio WPM contendo os reguladores de crescimento BAP, cinetina e zeatina nas concentrações 2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ . Este experimento foi delineado em esquema fatorial (3x3) e os fatores analisados foram: citocinina utilizada (zeatina, cinetina e BAP) e diferentes concentrações de cada citocinina (2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ ). A variável analisada foi a porcentagem de explantes responsivos (explantes que regeneraram brotos).

### 5.3.2 Efeito de diferentes concentrações de zeatina

Foram utilizadas raízes de plantas de *Populus* com 5 meses desde a última repicagem. Os explantes foram cultivados em placas de Petri com meio WPM contendo zeatina nas concentrações de 7, 14 e 21  $\mu\text{M}$ .

Os brotos regenerados com aproximadamente 2 cm foram transferidos para frascos com 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro contendo 50 mL de meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, sendo mantidos em sala de crescimento.

### 5.3.3 Efeito da idade da raiz

Foram utilizadas raízes de plantas com 6 ou 2 meses desde a última repicagem. Os explantes provenientes de plantas com 6 meses foram denominados "velhos" e de plantas com 2 meses "jovens". As raízes foram cultivadas em placas de Petri com meio WPM contendo zeatina na concentração de 14  $\mu\text{M}$ .

#### 5.4 ACLIMATIZAÇÃO

Foram aclimatizadas 20 plantas enraizadas, com aproximadamente 7 cm de altura, de cada tratamento do experimento com diferentes concentrações de zeatina. Em cada frasco contendo as plantas cultivadas em meio MS, foram adicionados 10 mL de água autoclavada e estes permaneceram 48 horas com as tampas entreabertas.

Após este período, as raízes das plantas foram lavadas para retirada do meio de cultura, sendo posteriormente transplantadas para vasos de 1,7 L, contendo substrato Agrinobre TNMIX autoclavado. Os vasos foram transferidos para casa de vegetação, sendo regados a cada 48 horas. Após 30 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência.

#### 5.5 AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após 30 dias e 60 dias, foi avaliada a porcentagem de explantes responsivos e número de brotos por explante de cada tratamento. Para cada experimento foram realizadas duas replicatas e cada tratamento foi constituído de 4 repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes.

Em todos os experimentos, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo Teste de Bartlett. Em seguida, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade no programa ASSISTAT versão 7.7.

#### 5.6 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

##### 5.6.1 Cepa bacteriana e plasmídeo

Para a transformação genética do híbrido *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4, foi utilizada a bactéria *Agrobacterium tumefaciens* cepa EHA105 contendo o plasmídeo pCAMBIA 1303 B21. O plasmídeo carrega o gene *hpt* da higromicina fosfotransferase e também os genes repórteres *gus* e *gfp*, ambos sob



As raízes utilizadas como explantes foram então cortadas em segmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, com o auxílio de bisturis e colocadas em contato com a solução. Os frascos foram vedados com filme de PVC, levados ao aparelho de ultrassom e posteriormente, os explantes foram mantidos em co-cultivo líquido por 30 minutos. Após este período, os explantes foram secos em papel filtro autoclavado e transferidos para placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo meio WPM com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, sem a adição de antibióticos. As placas foram levadas para BOD com temperatura de 23°C aonde permaneceram por 48 horas, para co-cultivo adicional no escuro.

Após este período, os explantes foram transferidos para meio de indução de brotações WPM com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, 3 mg L<sup>-1</sup> de zeatina, 250 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina (para eliminar a *Agrobacterium*) e 1 mg L<sup>-1</sup> de higromicina (agente seletivo) e foram levados para sala de crescimento. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2°C.

Os explantes foram repicados a cada 15 dias para novo meio de cultura, nas mesmas condições. Brotos com aproximadamente 2 cm de altura foram isolados das raízes e colocados em frascos com 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro contendo 50 mL de meio MS, para alongamento e enraizamento, com a adição de 250 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina e 1 mg L<sup>-1</sup> de higromicina. Foram realizadas repicagens a cada 30 dias.

### 5.6.3 Efeito de diferentes períodos de ultrassom

Para avaliar o efeito do ultrassom na eficiência de transformação, após o corte dos 40 explantes por tratamento (provenientes de plantas com 5 meses desde a última repicagem) os frascos contendo a solução bacteriana e as raízes foram vedados com filme de PVC e levados ao aparelho de ultrassom. Os explantes foram então submetidos aos respectivos períodos de ultrassom, 30 ou 60 segundos, e após o período de 30 minutos na solução com a *Agrobacterium tumefaciens*, foram secos e transferidos para meio de co-cultivo sólido por 48 horas.

#### 5.6.4 Efeito do ultrassom na viabilidade da *Agrobacterium*

Neste experimento, os segmentos de raízes (provenientes de plantas com 5 meses desde a última repicagem) foram colocados em frascos, com 50 mL de meio MS/2 contendo ou não a *Agrobacterium tumefaciens*. Os frascos foram vedados com filme de PVC e submetidos a 30 segundos de ultrassom. No frasco sem a bactéria, esta foi adicionada logo após a aplicação do ultrassom. Após 30 minutos os explantes foram secos e transferidos para o meio de co-cultivo sólido por 48 horas.

#### 5.6.5 Efeito de co-cultivo líquido em meio MS/2 ou semissólido em meio WPM

Neste experimento, os explantes (provenientes de plantas com 4 meses desde a última repicagem) foram submetidos a 30 segundos de ultrassom e permaneceram 30 minutos em contato com a solução bacteriana, sendo posteriormente divididos em dois tratamentos: secos em papel filtro e submetidos a co-cultivo de 48 horas no meio WPM semissólido sem antibióticos, ou co-cultivo de 48 horas em meio MS/2 líquido (contendo a *Agrobacterium*).

### 5.7 ANÁLISE MOLECULAR DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

#### 5.7.1 Extração de DNA e PCR

Foi extraído o DNA genômico de folhas (150 mg) provenientes dos eventos putativos transformados mantidos *in vitro*. Estas foram maceradas em microtubo de 2 mL, contendo 3 *beads* de tungstênio em cada, em macerador automático Tissue Lyser® (Qiagen). Para extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB 2% (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Como controles positivos foram utilizados os plasmídeos, extraídos por MiniPrep de *Escherichia coli*, mantidos em freezer a -20°C.

As amostras foram submetidas à reação de PCR para amplificação da sequência do gene repórter *gus* de 400 pb. O seguinte programa de temperatura foi utilizado: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Para as reações de amplificação foram utilizados: 0,3 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl<sub>2</sub>

(50mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada) e 1 µL de Taq polimerase, para um volume final de 25 µL. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

## 5.8 AVALIAÇÕES, DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos 30 e 60 dias após a transformação genética, foi avaliada a porcentagem de explantes que regeneraram brotos e o número de brotos por explante. Foi calculada a eficiência de seleção através do número de eventos com a presença do gene *gus* confirmada por PCR, dentre o número total de eventos avaliados por tratamento.

Para cada experimento foram realizadas duas replicatas e cada tratamento foi constituído de 4 repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes. Em todos os experimentos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, a homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo Teste de Bartlett. Em seguida, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade no programa Assistat versão 7.7.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ORGANOGÊNESE A PARTIR DE RAÍZES DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

#### 6.1.1 Efeito de diferentes citocininas

Foi avaliado o efeito de zeatina, cinetina e BAP em diferentes concentrações na organogênese a partir de raízes do clone 717-1B4. A porcentagem de explantes que formaram brotações foi de até 83,75% quando a menor concentração de BAP foi utilizada, aos 30 dias (TABELA 1).

Com o aumento da concentração de BAP foi observada uma redução nas porcentagens de explantes responsivos enquanto que nos meios com zeatina as porcentagens de regeneração foram sempre altas, variando entre 67,5 e 82,5%

(TABELA 1). Os resultados obtidos aos 60 dias apresentaram o mesmo perfil de resposta (dados não mostrados).

TABELA 1 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CITOCININAS ZEATINA, CINETINA E BAP EM 3 CONCENTRAÇÕES (2,2, 4,4 e 8,8 µM) AOS 30 DIAS

Citocinina	Concentração (µM)		
	2,2	4,4	8,8
<b>Zeatina</b>	67,50 <sup>aA</sup>	78,75 <sup>aA</sup>	82,50 <sup>aA</sup>
<b>Cinetina</b>	46,25 <sup>aA</sup>	23,75 <sup>bA</sup>	40,00 <sup>bA</sup>
<b>BAP</b>	83,75 <sup>aA</sup>	53,75 <sup>abAB</sup>	16,25 <sup>bB</sup>
CV (%)	25,44		

Valores seguidos de letras idênticas minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade. FONTE: o autor (2016).

Com o uso da cinetina, em todas as concentrações as porcentagens de explantes responsivos foram inferiores a 50% (TABELA 1). Para *P. deltoides*, 43-45% das raízes formaram brotos para 2 clones em meio líquido contendo 1,38 µM de cinetina, valores semelhantes aos obtidos no presente estudo (YADAV et al., 2009). No entanto, em outro estudo para *P. deltoides*, quando BAP, zeatina e cinetina foram usados na organogênese a partir de raízes, os autores não observaram resposta com zeatina e cinetina, apenas na presença de 1,1 a 3,3 µM de BAP (CHATURVEDI et al., 2004).

Por outro lado, quando testado o uso de zeatina e BAP na organogênese a partir de nós e entrenós de 5 clones da mesma espécie, foi observado que o melhor resultado dentre os clones foi obtido com entrenós utilizando a zeatina na concentração de 4,6 µM (100% de resposta). Quando um terceiro clone foi avaliado, a porcentagem de explantes responsivos foi de 43% utilizando a mesma concentração desta citocinina (CAVUSOGLU et al., 2011). Esses resultados apontam para a importância do fator genético na resposta a diferentes reguladores vegetais.

Com relação à organogênese de *Populus*, a resposta morfogênica depende principalmente da espécie, genótipo e pode ser manipulada e controlada *in vitro* através da alteração da proporção auxina/citocinina, a composição do meio de cultura e outros fatores ambientais (CONFALONIERI, 2003). As variações encontradas na resposta *in vitro* a diferentes reguladores podem ocorrer devido ao nível de sensibilidade celular ao regulador, dependendo da origem do explante e dos

níveis hormonais endógenos. Além disso, os níveis de citocininas podem ser afetados pela degradação, conjugação, hidrólises de suas formas conjugadas e interconversões (KLEMS et al., 2011).

As citocininas já avaliadas para a organogênese a partir de raízes de *Populus* são zeatina, BAP, cinetina, 2iP e TDZ. No geral, BAP e zeatina tem produzido os melhores resultados para organogênese em concentrações de 1 a 4  $\mu\text{M}$  e 1 a 5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O TDZ aumenta a formação de brotos em baixas concentrações (0,05 a 2  $\mu\text{M}$ ) enquanto que a cinetina e o 2iP produzem os piores resultados (DOUGLAS, 1989). No entanto, a porcentagem de explantes responsivos não é citada em muitos trabalhos de organogênese de *Populus* a partir de raízes. Para *P. alba*, espécie parental do híbrido *P. tremula x P. alba*, Tsevetkov et al. (2007) observaram até 96,7% de explantes formando brotos após sete semanas quando utilizado 0,02  $\mu\text{M}$  de TDZ, valor semelhante aos nossos, obtidos com BAP e zeatina nas concentrações de 2,2 e 8,8  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Lakshmi et al (2013) citam que os bons resultados na organogênese obtidos com BAP em relação a outros reguladores como cinetina e 2iP, devem-se à habilidade do BAP de induzir a produção endógena de zeatina, um regulador vegetal natural.

Com relação ao número de brotos por explante, foram observados os maiores valores nas concentrações de 8,8  $\mu\text{M}$  de zeatina e 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP, correspondendo a 2 brotos por explante em cada tratamento. Embora não tenham sido analisados estatisticamente, observou-se uma tendência de aumento no número de brotos com o aumento da concentração de zeatina e uma diminuição com o aumento da concentração de BAP, enquanto a concentração não pareceu influenciar na resposta para esta característica quando a cinetina foi utilizada (TABELA 2).

TABELA 2 - NÚMERO DE BROTOS POR EXPLANTE DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CITOCININAS ZEATINA, CINETINA E BAP EM 3 CONCENTRAÇÕES (2,2, 4,4 e 8,8  $\mu\text{M}$ ) AOS 30 DIAS

Citocinina	Concentração ( $\mu\text{M}$ )		
	2,2	4,4	8,8
Zeatina	1	1	2
Cinetina	1	1	1
BAP	2	2	1

Com a cinetina foi obtido um broto por explante em todas as concentrações (TABELA 2). Son e Hall (1990), utilizando raízes de *Populus alba x Populus grandidentata*, também obtiveram o menor número médio de brotos com a cinetina em comparação ao BAP e a zeatina (em torno de 3,5 brotos por explante).

Quando comparados na organogênese a partir de raízes para quatro clones de *P. deltoides*, BAP, zeatina, cinetina e 2iP, Chaturvedi et al. (2004) observaram que o aumento da concentração de BAP também diminuiu o número de brotos por explante. Em 1,1  $\mu\text{M}$  de BAP foi observado de 8,8 a 10,6 brotos por raiz, dependendo do clone.

Son e Hall (1990) publicaram resultados similares em um estudo no qual foi avaliada a organogênese de brotos através de segmentos de raízes com 8-10 cm, de dois clones de *Populus alba x Populus grandidentata* sob diferentes reguladores (BAP, cinetina, 2iP e zeatina) em concentrações que variaram de 0,05 a 50  $\mu\text{M}$ . Estes autores também observaram que quando utilizado BAP, a indução de brotos foi maior nas concentrações mais baixas e acima de 14  $\mu\text{M}$  não houve formação de brotos. Neste estudo, a citocinina que induziu o maior número de brotos para os dois clones foi a zeatina, sendo obtidos em torno de 100 brotos por segmento, valor bem acima do observado em outros estudos.

A zeatina foi mais efetiva na regeneração de brotos de *Populus tremula* a partir de folhas e pecíolos (72,1%) em um estudo de Huang e Dai (2011) quando comparada com BAP e TDZ. Assim como no trabalho de Dai, Cheng e Sargent (2003) que avaliaram a organogênese de 2 híbridos de *Populus* através de explantes foliares utilizando 4 combinações de citocininas e auxinas. Para a indução de calos, a combinação de zeatina com ANA ou AIB foi mais eficiente do que BAP com as mesmas auxinas. Com relação à indução de brotos, a zeatina e o TDZ nas concentrações de 9,12  $\mu\text{M}$  e 0,045  $\mu\text{M}$  respectivamente, forneceram os melhores resultados (95,7% dos explantes responderam com a zeatina e 93,6% com o TDZ em meio WPM). Os autores também realizaram a transformação genética, e para estes experimentos, através da análise dos resultados obtidos de eficiência de regeneração e qualidade dos brotos, a zeatina foi escolhida.

A melhor resposta obtida com a zeatina pode ter ocorrido devido a sua maior afinidade com os receptores nas plantas, pelo fato de ser uma citocinina altamente ativa fisiologicamente e também devido à presença de um grupo OH alílico altamente reativo na cadeia lateral (CHAUHAN, 2008; OSUGI; SAKAKIBARA, 2015).

Embora no meio com o BAP em baixa concentração tenha sido observada alta porcentagem de explantes responsivos (83,75%), com número de brotos por explantes que não diferiram do observado para a zeatina (TABELA 1) os brotos obtidos nos tratamentos com BAP apresentaram morfologia das folhas anormal e não se desenvolveram, permanecendo atrofiados (FIGURA 3). Devido a isto, a zeatina foi escolhida como melhor citocinina para indução de brotos a partir de raízes, dentre as utilizadas neste experimento.

No cultivo *in vitro* de maçã Magyar-TáBori et al. (2010) descrevem que embora muito utilizado o BAP pode causar efeitos adversos como dificuldade de enraizamento, toxicidade, hiperhidricidade, brotos atrofiados e formação de calos, provavelmente devido à glicosilações ou a conjugação com a alanina, que resulta em derivados biologicamente inativos, mas quimicamente estáveis, ocasionando depois em uma lenta liberação destes. No cultivo *in vitro* de banana, Jafari, Othman e Khalid (2011) também relataram a obtenção de pequenos aglomerados de brotos atrofiados utilizando altas concentrações de BAP (33  $\mu\text{M}$ ), o qual foi controlado com a redução da concentração para 22  $\mu\text{M}$ . Segundo os autores, este resultado sugere que uma alta concentração de BAP antes da iniciação de gemas não é essencial causando uma redução no número de brotos e a anormalidade.

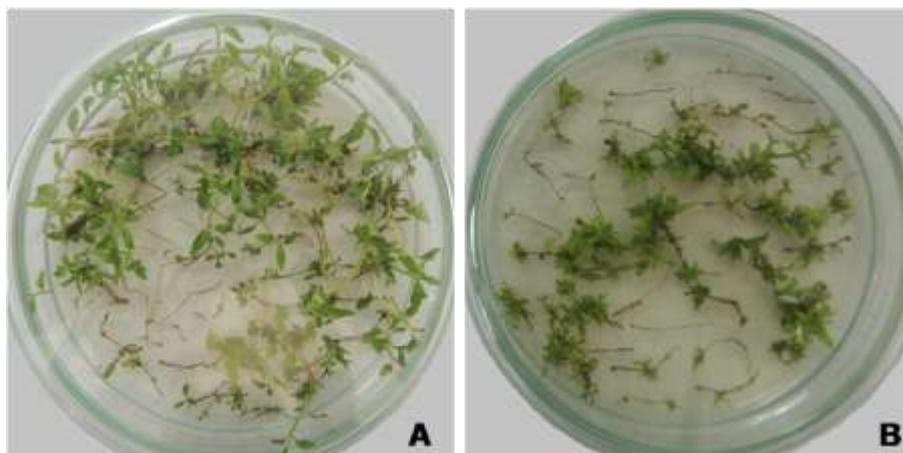
Resultados semelhantes foram obtidos por Coleman e Ernst (1989) em um estudo no qual foi avaliada a influência de BAP, 2iP e zeatina na organogênese a partir de segmentos internodais de *Populus deltoides*. Os autores descreveram que concentrações de BAP acima 2,2  $\mu\text{M}$  causaram a morte do tecido em todos os genótipos avaliados. A fitotoxicidade de BAP já foi reportada também para *Salix*, gênero irmão de *Populus*, por Bergman, Arnold e Eriksson (1985), no qual em concentrações acima de 5  $\mu\text{M}$  não foram obtidos brotos e os explantes morreram.

Quando avaliada a influência de BAP (0,44, 0,89, 1,78  $\mu\text{M}$ ) e TDZ (0,0045, 0,045 e 0,45  $\mu\text{M}$ ) na formação de gemas em segmentos de 1,5-2,0 cm de raízes de *Populus tremula*, Vinocur et al. (2000) observaram um número médio de gemas de 5,5 por segmento na concentração de 0,44  $\mu\text{M}$  de BAP o qual também decresceu nas concentrações mais altas.

Um alto número de brotos por explante (variando entre 5 e 39,3) também foi observado quando o TDZ foi utilizado para *P. alba*, *P. tremula* e *P. tremula* x *P. tremuloide* (TSVETKOV et al., 2007; SHERIF; KHATTAB, 2011), no entanto, este regulador vegetal não foi utilizado no presente estudo.

Através dos resultados obtidos acredita-se que concentrações de BAP inferiores às testadas no presente trabalho poderiam ter levado a um maior número de brotos por raízes e de explantes responsivos, assim como a organogênese de brotos com morfologia normal.

FIGURA 3 - BROTOS A PARTIR DE RAÍZES DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 PROVENIENTES DO EXPERIMENTO COM DIFERENTES REGULADORES AOS 30 DIAS. A. 8,8  $\mu$ M DE ZEATINA. B. 2,2  $\mu$ M DE BAP



FONTE: o autor (2016).

#### 6.1.2 Efeito da concentração de zeatina

Como no experimento anterior com o uso da zeatina foi observado que o número de brotos por explante responsivo aumentou com o aumento da concentração, foram testadas concentrações mais altas para verificar se esses valores poderiam ser ainda maiores. Dentre as 3 concentrações de zeatina testadas não foi observada diferença significativa na porcentagem de explantes responsivos aos 30 dias (TABELA 3). Os valores obtidos aos 60 dias apresentaram o mesmo padrão de resposta (dados não mostrados).

No entanto, com relação ao número médio de brotos por explante, o maior valor encontrado foi na concentração de 14  $\mu$ M, em torno de 4 brotos. Acima desta concentração, parece haver uma tendência de diminuição nesta variável, o que pode ter ocorrido devido à elevada concentração da citocinina a qual pode ter sido tóxica para os explantes (TABELA 3).

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTO POR EXPLANTE DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ZEATINA (7, 14 e 21  $\mu$ M) AOS 30 DIAS

Zeatina ( $\mu$ M)	Explantes responsivos (%)	Número de brotos por explante
7	80,00 <sup>a</sup>	3
14	87,50 <sup>a</sup>	4
21	86,25 <sup>a</sup>	3
CV (%)	18,49	

Valores seguidos de letras idênticas não diferem entre si pelo teste F de ANOVA. FONTE: o autor (2016).

Foi avaliada também a taxa de sobrevivência de plantas de *Populus* (mantidas em meio MS sólido e enraizadas) que foram aclimatizadas e transplantadas, provenientes dos 3 tratamentos com zeatina. As taxas foram de 90% para 7  $\mu$ M de zeatina e 95% para 14 E 21  $\mu$ M (TABELA 4). Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados em outros trabalhos na literatura quando raízes foram utilizadas como explantes (SON E HALL, 1990, CHATURVEDI et al., 2004, YADAV et al., 2009). As plantas em casa de vegetação apresentaram desenvolvimento normal (FIGURA 4).

TABELA 4 - TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE PLANTAS DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 ACLIMATIZADAS E TRANSPLANTADAS MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 30 DIAS

Zeatina ( $\mu$ M)	Taxa de sobrevivência (%)
7	90
14	95
21	95

FONTE: o autor (2016).

FIGURA 4 - PLANTA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 48 DIAS



FONTE: o autor (2016)

### 6.1.3 Efeito da idade das raízes na organogênese

Foi obtido um número de explantes responsivos superior quando utilizadas raízes provenientes de plantas com 6 meses após a última repicagem aos 30 dias (TABELA 5). Porém, aos 60 dias, os valores entre os dois tratamentos não diferiram estatisticamente, demonstrando que as raízes “jovens” (2 meses) apresentaram um atraso na resposta nos primeiros 30 dias, mas aos 60 dias os valores foram estatisticamente iguais.

TABELA 5 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTOS POR EXPLANTE DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DA IDADE DA RAÍZ AOS 30 DIAS

Idade	Explantes responsivos (30 d)	Explantes responsivos (60 d)	Número de brotos por explante (30 d)	Número de brotos por explante (60 d)
“Jovens”	37,5 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	2	3
“Velhas”	82,5 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	2	3
CV (%)	23,15	20,32		

Valores seguidos de letras idênticas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade. FONTE: o autor (2016).

Frequentemente, um tecido vegetal mais jovem é mais responsivo a reguladores vegetais e a outros fatores do que tecidos mais velhos. Isto se deve provavelmente à porção do genoma que controla a formação de órgãos em estágios iniciais de desenvolvimento a qual é menos reprimida, ou mais facilmente ativada, por tratamento hormonal do que tecidos mais velhos, que são células altamente diferenciadas (BROWN; SOMMER, 2013).

Becerra, Forero e Góngora (2004) avaliaram a influência da idade de explantes foliares de *Passiflora edulis* cultivados em meio MS suplementado com BAP e cinetina. Os resultados demonstraram que o maior número de brotos foi obtido com explantes com 2 meses (5,12) o qual decresceu para 2,83 com 3 meses e com 6 meses para 1,60 brotos. O maior número de brotos com tecidos jovens também foi encontrado por Franklin, Sheeba e Sita (2004) no cultivo de raízes de *Solanum melongena* e Ibrahim e Debergh (2001) para *Rosa hybrida*.

Porém, em alguns casos, o número de brotos por explante é inferior com tecidos mais jovens, como no trabalho de Son e Hall (1990). Os autores avaliaram a resposta de raízes com 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, após a última repicagem e raízes com 60 dias forneceram maior número de brotos para os clones em estudo.

Além disso, ocasionalmente, a idade do explante pode não interferir na resposta *in vitro*, como no estudo realizado por Cao e Hammerschlag (2000) com *Vaccinium corymbosum*, no qual foi observado que a organogênese não foi influenciada pela idade dos explantes foliares.

O efeito da idade do explante foi avaliado neste estudo para desenvolver a melhor estratégia de repicagem do material mantido em meio de multiplicação. O fato de não haver diferença estatística entre o material das duas idades facilita nos experimentos de transformação genética, no sentido de que material de dois meses já pode ser usado, mas se não está sendo utilizado com frequência, o material pode ficar por seis meses no mesmo meio de multiplicação sem perder o potencial regenerativo.

Apesar da avaliação final ter sido realizada aos 60 dias, foi observada uma capacidade de regeneração de brotos por até 90 dias, período no qual o experimento foi mantido em sala de crescimento, com repicagens a cada 15 dias e transferência de brotos com aproximadamente 2 cm para meio de alongamento e enraizamento MS. Acredita-se que o período de capacidade organogênica das raízes possa ser ainda maior, permitindo a obtenção de um elevado número de brotos. Quando realizado o cultivo *in vitro* de raízes de *Citrus aurantifolia*, Bhat, Chitralekha e Chandel (1992) observaram uma retenção da capacidade regenerativa das raízes ao longo de 3 anos.

Em todos os experimentos realizados de organogênese de *Populus* a partir de raízes a organogênese ocorreu sem a formação visível de calos, como também descrito nos trabalhos de Tsvetkov, Hausman e Laurent (2007), Sheriff e Khattab (2011) e Son e Hall (1990).

Os números médios de brotos por explante encontrados neste estudo foram inferiores aos encontrados em literatura para segmentos de raízes de diferentes espécies de *Populus*. Vinocur et al. (2000) obtiveram 5,5 gemas por explante utilizando BAP e 42 quando utilizado meio MS líquido suplementado com TDZ; Chaturvedi et al. (2004) obtiveram um número máximo de 7,8 brotos por segmento de raiz utilizando meio MS líquido suplementado com BAP; Tsvetkov, Hausman e Jouve (2007) obtiveram em torno de 6 brotos por segmento utilizando meio MS semissólido suplementado com TDZ; Sheriff e Khattab (2011) obtiveram de 5,8 até 39,3 brotos para explantes de raízes de 3 espécies de *Populus* cultivados em meio MS semissólido com TDZ. Além das citocininas, outro fator que pode ter conduzido a

este resultado foi o meio MS utilizado nos trabalhos citados, o qual não foi utilizado neste estudo.

## 6.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

O protocolo de transformação genética mais utilizado para *Populus* descrito por Leplé et al. (1992) utilizando explantes foliares, foi testado e foi observada alta formação de calos, baixa regeneração de brotos e alta oxidação, não sendo obtidos eventos transgênicos. Resultados similares foram publicados por Ma, Strauss e Meilan (2004) no qual os autores afirmam que com este protocolo não obtiveram sucesso então realizaram modificações no mesmo. Devido a isto, foi dado início ao desenvolvimento de um protocolo de transformação a partir de raízes, pois foi percebido em experimentos de organogênese que estas apresentaram bom potencial regenerativo.

### 6.2.1 Efeito de diferentes períodos de ultrassom

Com relação à porcentagem de explantes responsivos não foi observada diferença significativa dentre os tratamentos utilizados (TABELA 6). Os valores obtidos para o número médio de brotos também foram similares, 66 brotos no tratamento com 30 s de ultrassom e 74 no tratamento com 60 s de ultrassom, aos 30 dias. Aos 60 dias os dados novamente não diferiram e o número médio de brotos foi semelhante nos dois tratamentos.

TABELA 6 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTOS POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU DIFERENTES PERÍODOS DE ULTRASSOM (30 E 60 s) NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21

Tratamento	Explantes responsivos (30 d)	Número de brotos (30 d)	Explantes responsivos (60 d)	Número de brotos (60 d)
30 s ultrassom	78,75 <sup>a</sup>	66	83,75 <sup>a</sup>	75
60 s ultrassom	82,5 <sup>a</sup>	74	85,50 <sup>a</sup>	82
CV (%)	24,71		22,63	

Valores seguidos de letras idênticas não diferem entre si pelo Teste F de ANOVA. FONTE: o autor (2017).

As porcentagens de explantes responsivos e número de brotos para os dois tratamentos foram semelhantes aos encontrados nos experimentos de organogênese realizados. Geralmente, o número de brotos obtidos em experimentos de transformação genética são inferiores aos de organogênese, devido ao estresse sofrido durante a transformação, co-cultivo com a bactéria, o agente seletivo e também pelo fato de o número de células transformadas ser pequeno. Sendo assim, os altos valores obtidos para estas variáveis sugerem que a seleção não foi eficiente.

É de extrema importância isolar as células transformadas das células não transformadas, que são a maioria, utilizando o agente seletivo. A concentração deste deve ser cuidadosamente escolhida para evitar ser abaixo do necessário e permitir um alto número de escapes ou quimeras, ou acima do ideal, causando a perda de plantas transformadas. Uma seleção forte, realizada nos primeiros estágios, pode reduzir o número de brotos viáveis, enquanto que uma seleção atrasada pode aumentar o número de escapes (PARVEEZ et al., 2007).

Em experimentos realizados anteriormente, foram testadas as concentrações de 1,5 e 3 mg L<sup>-1</sup> de higromicina (dados não mostrados). A concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> permitiu a organogênese de brotos, porém, em aproximadamente 30 dias estes morreram. Utilizando a concentração de 3 mg L<sup>-1</sup>, os brotos não se desenvolveram e morreram em menos de 30 dias. Portanto, acredita-se que a concentração inicial utilizada deve ser em torno de 1 mg L<sup>-1</sup>, para permitir a regeneração de brotos e não causar a morte dos explantes transformados, porém é necessária sua elevação ao longo do tempo para causar a morte de escapes.

Outro fator que pode ter ocasionado essa resposta dos explantes é o ultrassom, que pode ter causado um efeito positivo na regeneração de brotos, tornando-os equivalentes aos resultados obtidos nos experimentos de regeneração. Já foram reportados diversos trabalhos com cultivo *in vitro* de espécies vegetais no qual o ultrassom apresentou um efeito positivo, como por exemplo, na cultura de calos de cenoura, estudo realizado por Bochu, Yoshikoshi e Sakanishi (1998). Neste estudo, os calos foram expostos a diferentes períodos de ultrassom (2 a 40 s), no início da suspensão celular. Utilizando 2 segundos, a taxa de crescimento celular foi superior ao controle. Porém, com 40 segundos, aproximadamente 75% das células sofreram danos.

Além deste, em um trabalho com cotilédones de *Cucurbita pepo*, os quais normalmente produzem um broto pequeno quando cultivados *in vitro*, Ananthakrishnan et al. (2007) obtiveram com o uso de 0,5 a 2 minutos de ultrassom, cinco vezes mais brotos, com crescimento maior, quando comparados ao controle.

Os mecanismos pelos quais as ondas de som podem afetar o crescimento e desenvolvimento da planta envolvem a alteração da permeabilidade das membranas e a conformação de enzimas ligadas a ela, modificação da atividade e/ou conformidade de diferentes enzimas envolvidas na regulação hormonal e mecanismos de defesa antioxidantes (SILVA, 2014).

Deve-se levar em consideração que o efeito obtido pode variar de acordo com a frequência, intensidade e duração do período de ultrassom, da sensibilidade do material vegetal e do tipo de recipiente utilizado (SILVA; DOBRÁNSZKI, 2014; ARIFIN et al., 2004). Para avaliar se o período de ultrassom provoca um aumento na organogênese a partir de raízes de *Populus*, devem ser realizados novos experimentos, avaliando esta variável com outros períodos de ultrassom e sem o seu uso, na organogênese e subsequente transformação genética.

Até o momento não foram realizadas as análises de biologia molecular para confirmação de plantas transgênicas, pois os brotos ainda não atingiram o tamanho suficiente. Os resultados serão utilizados para poder inferir se o período de 60 s pode influenciar positivamente, aumentando a taxa de transformação genética devido a uma infecção mais eficiente da *Agrobacterium tumefaciens* ou negativamente, pelo fato de um período maior de ultrassom poder causar a morte da bactéria.

No entanto, o uso com sucesso da *Agrobacterium tumefaciens* juntamente com o ultrassom já foi descrito para algumas espécies. Como observado por Trick e Finer (1997), que obtiveram um aumento na expressão transiente do gene *gus* de 100 a 1400 vezes com cotilédones de soja pelo período de 0,2 a 10 segundos; embriões zigóticos de milho pelo período de 0 a 30 segundos; plântulas de trigo submetidas a 0 a 100 segundos de ultrassom e segmentos foliares de feijão de corda submetidos a 0 a 60 segundos de ultrassom. Porém, apesar de diversos relatos positivos, o aumento não é expressivo em todos os casos, pois, é descrita também a dificuldade em combinar a competência celular para a transformação com a totipotência (BIRCH, 1997).

### 6.2.2 Efeito do ultrassom na viabilidade da *Agrobacterium tumefaciens*

Apesar de já ser descrito em literatura o sucesso do uso do ultrassom na obtenção de plantas transgênicas, neste trabalho também objetivou-se avaliar se o ultrassom pode interferir negativamente na integridade da *Agrobacterium tumefaciens*. Para tal, foi testado o uso do ultrassom antes ou durante o co-cultivo líquido com a bactéria.

Aos 30 dias foi obtido um número de brotos de 81 e 112 para os tratamentos de ultrassom sem e com a bactéria, respectivamente. Quanto à porcentagem de explantes responsivos não houve diferença estatística dentre os tratamentos, provavelmente pelo fato de os períodos de ultrassom e as condições de cultivo não diferirem entre eles, sugerindo que não influenciaram de maneira diferente os tecidos vegetais (TABELA 7).

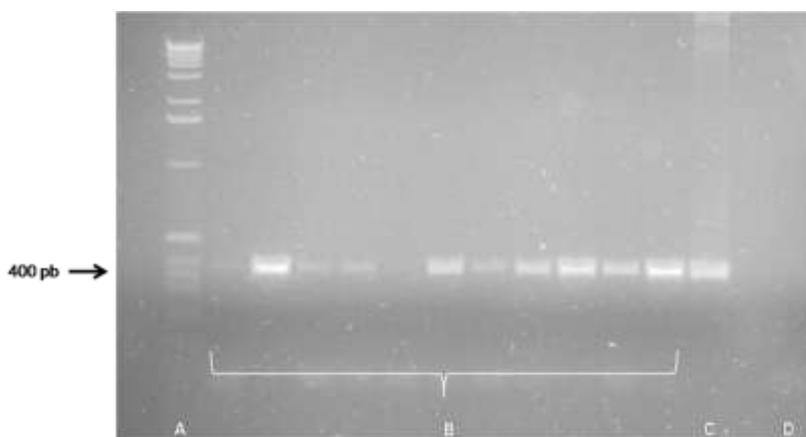
TABELA 7 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTOS POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU O EFEITO DO ULTRASSOM NA VIABILIDADE DA *Agrobacterium* NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21

Tratamento	Explantes responsivos (30 d)	Número de brotos (30 d)	Explantes responsivos (60 d)	Número de brotos (60 d)
Ultrassom sem a bactéria	66,25 <sup>a</sup>	81	76,25 <sup>a</sup>	89
Ultrassom com a bactéria	81,25 <sup>a</sup>	112	83,75 <sup>a</sup>	123
CV (%)	23,65		16,28	

Valores seguidos de letras idênticas não diferem entre si pelo Teste F de ANOVA. FONTE: o autor (2017).

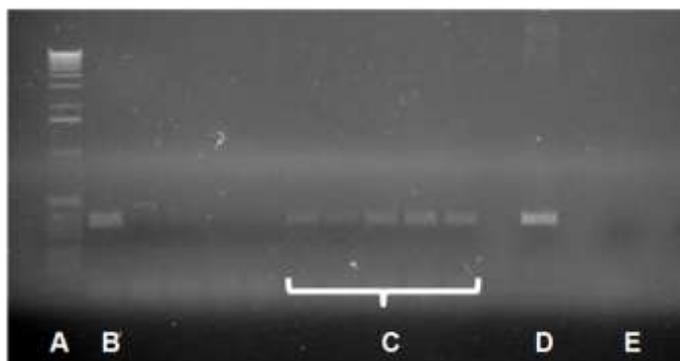
Foram obtidas 11 plantas transgênicas dentre 21 avaliadas no tratamento de ultrassom sem a bactéria e 6, dentre 10, no tratamento de ultrassom com a bactéria, com presença do gene *gus* confirmada por PCR (FIGURAS 5 e 6). As eficiências de seleção obtidas foram, portanto, 52,38% e 60%, respectivamente

FIGURA 5 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 DO TRATAMENTO DE ULTRASSOM SEM A BACTÉRIA



A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Eventos 1 a 11 de *Populus tremula* x *Populus alba*. C. Controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 1303 B21). D. Controle negativo. FONTE: O autor (2017).

FIGURA 6 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 DO TRATAMENTO DE ULTRASSOM COM A BACTÉRIA



A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Evento 1 de *Populus tremula* x *Populus alba*. C. Eventos 2, 3, 4, 5 e 6. D. Controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 1303 B21) E. Controle negativo. FONTE: o autor (2017).

Em alguns casos, o ultrassom pode causar danos à integridade da bactéria, como demonstrado por Arifin et al. (2004), em um estudo no qual foram avaliados os efeitos biológicos da exposição da *Agrobacterium* ao ultrassom. Os autores observaram que a frequência de desenvolvimento de colônias caiu para 77% com o uso de 1 minuto de ultrassom. Quanto ao número de colônias, com uma exposição de 5 minutos foi observada uma redução de 170 para 14 colônias. A morte celular foi atribuída à ruptura causada pela exposição ao ultrassom. Porém, apesar das reduções drásticas encontradas, os autores observaram que ainda assim o período de até 5 minutos pode ser utilizado na transformação genética de cana-de-açúcar e

auxilia na redução dos efeitos negativos encontrados com o crescimento exagerado da *Agrobacterium*.

Além disso, é descrito o uso do ultrassom na inativação de microorganismos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, utilizando o período de 4,3 minutos, o qual ocasiona uma redução na atividade bacteriana de 90% (PAGÁN et al., 1999). Portanto, conforme já citado, alguns fatores como intensidade, freqüência e período do ultrassom, sensibilidade do material vegetal e recipiente utilizados, interferem no resultado obtido devendo ser ajustados conforme o objetivo proposto.

Com relação ao uso de raízes, quando realizada a transformação genética de *Arabidopsis*, foram obtidas eficiências de transformação de 20 a 80%, a qual foi considerada pelos autores, superior a outros trabalhos com outros explantes (VALVEKENS; MONTAGU; LUSEBETTENS, 1988). Resultados positivos também foram encontrados na transformação genética de raízes de *Medicago truncatula*, no qual foi obtida uma eficiência de transformação de 41,3%. Os autores citam que a eficiência de transformação e o período necessário para a produção de plantas transgênicas são semelhantes aos experimentos utilizando folhas como explantes. Porém, as raízes apresentam as vantagens de oferecerem 2 a 3 vezes mais explantes por planta quando comparadas à folhas, nesta espécie (CRANE et al., 2006).

### 6.2.3 Efeito de co-cultivo líquido em meio MS/2 ou semissólido em meio WPM

Aos 30 dias, foram obtidos números médios de 37 e 11 brotos por tratamento nos experimentos de co-cultivo semissólido e líquido, respectivamente, enquanto que aos 60 dias, os valores subiram para 130 e 112. Com relação à porcentagem de explantes responsivos o tratamento de co-cultivo semissólido apresentou um valor quase 4 vezes superior ao co-cultivo líquido, aos 30 dias, no entanto aos 60 dias a porcentagem de explantes responsivos não diferiu estatisticamente (TABELA 8).

TABELA 8 - PORCENTAGEM DE EXPLANTES RESPONSIVOS E NÚMERO DE BROTO POR TRATAMENTO NO EXPERIMENTO QUE AVALIOU A INFLUÊNCIA DO CO-CULTIVO SEMISSÓLIDO OU LÍQUIDO NA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE RAÍZES DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21

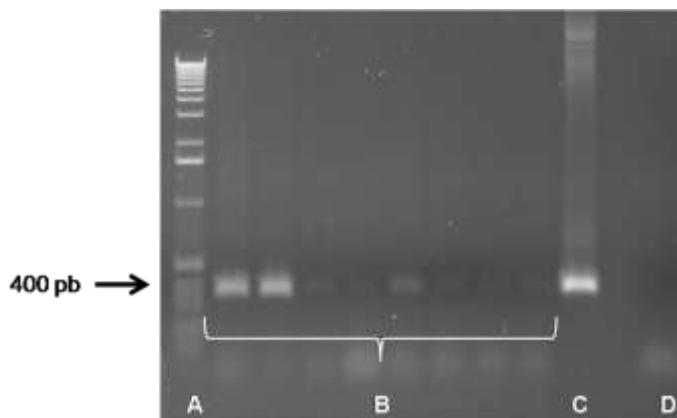
Tratamento	Explantos responsivos (30 d)	Número de brotos (30 d)	Explantos responsivos (60 d)	Número de brotos (60 d)
<b>Co-cultivo semissólido</b>	46.25 <sup>a</sup>	37	72.50 <sup>a</sup>	130
<b>Co-cultivo líquido</b>	12.50 <sup>b</sup>	11	60.00 <sup>a</sup>	112
<b>CV (%)</b>	24,71		22,64	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. FONTE: o autor (2017).

Neste experimento, os valores encontrados para explantes responsivos foram inferiores aos demais experimentos de transformação genética aos 30 dias, provavelmente devido à idade dos explantes, pois foram utilizadas raízes provenientes de plantas com 4 meses desde a última repicagem, enquanto que nos outros foram utilizadas raízes de plantas com 5 meses desde a última repicagem. Sendo assim, os valores obtidos foram similares aos encontrados quando utilizadas raízes “jovens” (2 meses desde a última repicagem) do experimento de organogênese no qual foram testadas diferentes idades.

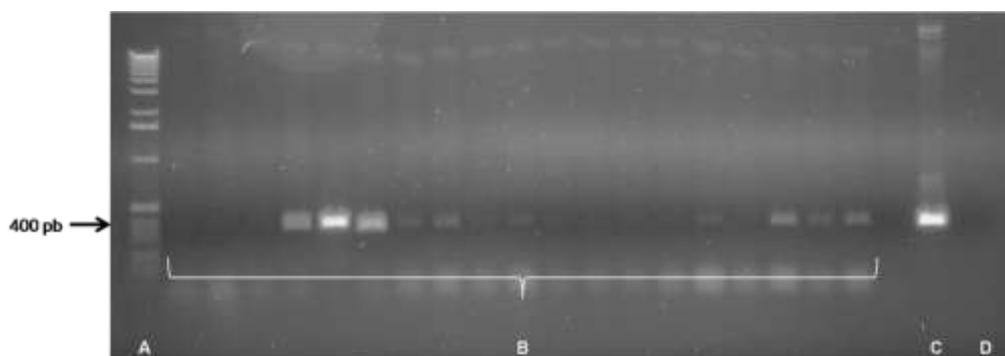
Foram obtidos 8 eventos transgênicos com presença confirmada do gene *gus* quando utilizado o co-cultivo em meio líquido, dentre os 15 brotos avaliados, obtendo-se uma eficiência de seleção de 53,33% (FIGURA 7). No tratamento de co-cultivo em meio semissólido, foram obtidos 19 eventos para os 27 analisados por PCR para os primers do gene *gus*, obtendo-se uma eficiência de seleção de 70,37% (FIGURA 8).

FIGURA 7 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B 4 NO TRATAMENTO DE CO-CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO



A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Eventos 1 a 8 de *Populus tremula X Populus alba*. C. Controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 1303 B21) D. Controle negativo. FONTE: O autor (2017).

FIGURA 8 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 NO TRATAMENTO DE CO-CULTIVO EM MEIO SEMISSÓLIDO



A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Eventos 1 a 19 de *Populus tremula X Populus alba*. C. Controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 1303 B21) D. Controle negativo. FONTE: o autor (2017)

Os protocolos de transformação genética de *Populus* descritos em literatura frequentemente utilizam meio semissólido para o co-cultivo. Para outras espécies já foram descritos estudos no quais foram comparados meios líquidos e semissólidos. Ghosh et al. (2009), em um estudo de transformação genética com suspensão celular embriogênica de banana Cavendish cultivar robusta, obtiveram eventos transgênicos apenas quando utilizado o co-cultivo em meio semissólido; Uranbey et al. (2005) estudaram a influência do meio líquido ou semissólido no período de co-cultivo de discos foliares de *Nicotiana tabacum*, no qual o co-cultivo líquido resultou em uma maior frequência de transformação; Khanna e Raina (1999) realizaram a

transformação genética do arroz e o co-cultivo em meio líquido apresentou melhores resultados, o qual foi atribuído pelos autores ao melhor acesso aos componentes do meio de cultura.

Durante o co-cultivo líquido, os explantes mantêm maior contato com a bactéria, diferentemente do co-cultivo semissólido, no qual neste experimento, os explantes ainda foram secos em papel filtro antes da transferência para o meio de cultura. O menor número de eventos transformados no tratamento utilizando co-cultivo líquido, assim como a porcentagem e número de brotos inferiores ao outro tratamento, pode ter ocorrido devido ao estresse causado aos explantes pelo maior contato com a *Agrobacterium*, o qual ocasiona a produção de etileno pelo tecido vegetal. O etileno, como demonstrado por Nonaka e Ezura (2014), inibe a transferência do T-DNA através da repressão dos genes *vir* sem afetar o crescimento da bactéria.

Como afirmado por Nanasato et al. (2013) condições de co-cultivo inadequadas levam a diversos fenômenos desfavoráveis como o crescimento excessivo da bactéria e/ou necrose dos explantes, resultando na diminuição da eficiência da transformação. Isto demonstra que as condições de co-cultivo devem ser otimizadas para a espécie e cepa bacteriana utilizadas.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que é possível obter plantas transgênicas, utilizando raízes como explantes, através dos protocolos de transformação genética e organogênese aqui descritos.

As raízes apresentam grande potencial regenerativo e demonstram facilidade na transformação genética, compreendendo uma ótima fonte de explantes para essas finalidades. Com base nos resultados observados para a organogênese de *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4, dentre os tratamentos realizados, o meio WPM suplementado com 14  $\mu$ M de zeatina demonstra ser o mais adequado. Para a transformação genética deste clone, dentre os fatores testados, indica-se o uso do co-cultivo em meio WPM semissólido.

## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, G.; SHARMA, C.; SRIVASTAVA, D. K. Thidiazuron: A potent cytokinin for efficient plant regeneration in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.) using leaf explants. **Annals of Forest Research**, v. 55, n. 2, p. 179–188. 2012.
- ANANTHAKRISHNAN, G. et al. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 3, p. 267–276. 2007.
- ARIFIN, N. et al. Effectiveness of Sonication on Diminishing Bacterial Overgrowth in Agrobacterium - mediated Transformation. **Plant Biotechnology**, v. 21, p. 53–56. 2004.
- BASSAM, N EL. POPLAR. In: BASSAN, N EL. **Bioenergy Crops - A Complete Reference to Species, Development and Applications**. Earthscan, 2010, p. 278-392.
- BECERRA, D. C.; FORERO, A. P.; GÓNGORA, G. A. Age and physiological condition of donor plants affect in vitro morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 87–90. 2004.
- BERGMAN, L.; ARNOLD, S. V. O. N.; ERIKSSON, T. Effects of N6-benzyladenine on shoots of five willow clones (*Salix* spp.) cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 4, p. 135–144. 1985.
- BHAT, S. R.; CHITRALEKHA, P.; CHANDEL, K. P. S. Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, n. 1, p. 19–25. 1992.
- BIRCH, R. G. PLANT TRANSFORMATION: Problems and Strategies for Practical Application. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 297–326. 1997.
- BISWAS, K. K. et al. An Improved System for Shoot Regeneration from Stem Explants of Lombardy Poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne). **American Journal of Plant Science**, v. 2012, n. 3, p. 1181–1186. 2012.
- BOCHU, W.; YOSHIKOSHI, A.; SAKANISHI, A. Carrot cell growth response in a stimulated ultrasonic environment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 12, n. 2, p. 89–95. 1998.
- BROWN, C. L.; SOMMER, H. E. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. **Tissue Culture in Forestry**. Springer Science & Business Media, 2013, p. 109-149.

BUSOV, V. B. et al. Genetic transformation: A powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. **New Phytologist**, v. 167, p. 9-18. 2005.

CAO, X.; HAMMERSCHLAG, F. A. Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. **HortScience**, v. 35, n. 5, p. 945–947. 2000.

CAVUSOGLU, A. et al. Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with tissue culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 16, p. 3216–3221. 2011.

CHAOQIANG JIANG; ZHAOPU LIU; QINGSONG ZHENG. Direct Regeneration of Plants Derived from in vitro Cultured Shoot Tips and Leaves of Poplar (*Populus x euramericana* “Neva”). **Journal of Life Sciences**, v. 9, n. 8, p. 366–372. 2015.

CHATURVEDI, H. C. et al. Production of cloned trees of *Populus deltoides* through in vitro regeneration of shoots from leaf, stem and root explants and their field cultivation. **Indian Journal of Biotechnology**, v.2, p. 203-208. 2004.

CHAUHAN, B.S. Hormones. In: \_\_\_\_\_ **Principles of Biochemistry and Biophysics**. Firewall Media, 2008, p. 319-372.

COLEMAN, G. D.; ERNST, S. G. In vitro shoot regeneration of *Populus deltoides*: effect of cytokinin and genotype. **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 8, p. 459–462. 1989.

CONFALONIERI, M. et al. In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: Synergy for forest tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 2, p. 109–138. 2003.

CRANE, C. et al. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium* rhizogenes-transformed hairy roots. **Planta**, v. 223, n. 6, p. 1344–1354. 2006.

DAI, W. H.; CHENG, Z. M.; SARGENT, W. Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from in vitro leaf tissues. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 39, n. 1, p. 6–11. 2003.

DOUGLAS, G. C. Poplar (*Populus* spp.). In: BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in agriculture and forestry. **Trees II**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1989, v. 5, p. 300–323.

FERREIRA, M. G.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, p. 220. 1996

FILICHKIN, S. A. et al. Alcohol-inducible gene expression in transgenic *Populus*. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 7, p. 660–667. 2006.

FRANKLIN, G.; SHEEBA, C. J.; LAKSHMI SITA, G. Regeneration of eggplant (*Solanum melongena* L.) from root explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 40, n. 2, p. 188–191. 2004.

GHOSH, A. et al. Establishment of embryogenic cell suspension cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation in an important Cavendish banana cv. Robusta (AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 97, n. 2, p. 131–139. 2009.

GRUNENVALDT, R. L. **Clonagem de Promotores Raiz-Específicos de *Eucalyptus grandis* E Validação em *Nicotiana tabacum***. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área de Concentração Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

HUANG, D.; DAI, W. Direct regeneration from in vitro leaf and petiole tissues of *Populus tremula* "Erecta". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 169–174. 2011.

IBRAHIM, R.; DEBERGH, P. C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from in vitro leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 88, n. 1, p. 41–57. 2001.

JAFARI, N.; OTHMAN, R. Y.; KHALID, N. Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on in vitro shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2446–2450. 2011.

JANSSON, S.; DOUGLAS, C. J. *Populus*: A Model System for Plant Biology. **Annu Rev Plant Biol**, v. 58, p. 435–458. 2007.

JOHN, E.; MAQBOOL, A.; MALIK, K. A. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation in *Populus Deltoides*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 46, n. 3, p. 1079–1086. 2014.

KERSTEN, B. et al. Genome sequences of *Populus tremula* chloroplast and mitochondrion: Implications for holistic poplar breeding. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–21. 2016.

KHANNA, H.; RAINA, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and superbinary vectors. **Functional Plant Biology**, v. 26, n. 4, p. 311–324. 1999.

KIM, M. KLOPFENSTEIN, N. B. CHUN, Y. W. *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Populus* Species. In: KLOPFENSTEIN et al. **Micropropagation, Genetic Engineering, and Molecular Biology of *Populus***. USDA Forest Service General Technical Report RM-GTR-297. 1997. p.51-59.

KLEMŠ, M. et al. Changes in cytokinin levels and metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) explants during in vitro shoot organogenesis induced by trans-zeatin and dihydrozeatin. **Plant Growth Regulation**, v. 65, n. 3, p. 427–437. 2011.

LAKSHMI, S. R. et al. Organogenesis from in vitro-derived leaf and internode explants of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - A vulnerable species of Western Ghats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 3, p. 421–430. 2013.

LEPLÉ, J. C. et al. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. **Plant Cell Reports**, v. 11, n. 3, p. 137–141. 1992.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327. 1981.

MA, C.; STRAUSS, S. H.; MEILAN, R. *Agrobacterium*-mediated transformation of the genome-sequenced poplar clone, *nisqually-1* (*Populus trichocarpa*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, n. 3, p. 311–312. 2004.

MAGYAR-TÁBORI, K. et al. The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 101, n. 3, p. 251–267. 2010.

MAHESHWARI, P.; KOVALCHUK, I. Efficient shoot regeneration from internodal explants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoides*. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 778–787. 2011.

MARTON, L; BROWSE, J. Facile transformation of Arabidopsis. **Plant Cell Reports**, v. 10, n.5, p.235-239. 1991.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**. p. 473-479. 1962.

NANASATO, Y. et al. Improvement of *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by combination of vacuum infiltration and co-cultivation on filter paper wicks. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 267–276. 2013.

NOIËL, N.; LEPÉ, J. C.; PILATE, G. Optimization of in vitro micropropagation and regeneration for *Populus x interamericana* and *Populus x euramericana* hybrids (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 12, p. 1150–1155. 2002.

NONAKA, S.; EZURA, H. *Agrobacterium* interaction mediated by ethylene and super-*Agrobacterium* conferring efficient gene transfer. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–7. 2014.

OSUGI, A.; SAKAKIBARA, H. Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? **BMC biology**, v. 13, n. 1, p. 102. 2015.

PAGÁN, R. et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* to ultrasonic waves under pressure at sublethal (manosonication) and lethal (manothermosonication) temperatures. **Food Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 139–148. 1999.

PARVEEZ, G. K. A. et al. Determination of minimal inhibitory concentration of selection agents for selecting transformed immature embryos of oil palm. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 133–146. 2007.

SHARMA, K. K.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; THORPE, T. A. Genetic transformation technology: Status and problems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 2, p. 102–112. 2005.

SHERIF, F. EL; KHATTAB, S. Direct shoot regeneration from leaf, root and stem internode segments of male poplar trees and the molecular analysis of variant regenerated plants. **Journal of American Science**. v. 7, n. 8, p. 200–206. 2011.

SILVA, J. A. T. Filter paper inhibits in vitro protocorm-like body formation in hybrid *Cymbidium* and reduces synseed germination, but buffers the negative impact of antibiotics. **Botanica Lithuanica**, v. 51, n. 1, p. 47–54. 2014.

SILVA, J. A. T.; DOBRÁNSZKI, J. Sonication and ultrasound: Impact on plant growth and development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 2, p. 131–143. 2014.

SON, S. H.; HALL, R. B. Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba* x *P. grandidentata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 20, n. 1, p. 53–57. 1990.

SONG, J. et al. Genetic transformation of *Populus trichocarpa* genotype Nisqually-1: A functional genomic tool for woody plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 11, p. 1582–1589. 2006.

THAKUR, A. K.; SRIVASTAVA, D. K. High-efficiency plant regeneration from leaf explants of male himalayan poplar (*Populus ciliata* wall.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, n. 2, p. 144–147. 2006.

TRICK, H. N.; FINER, J. J. SAAT : sonication-assisted *Agrobacterium* -mediated transformation. **Transgenic Research**, v. 336. 1997.

TSVETKOV, I.; HAUSMAN, J.; JOUVE, L. Thidiazuron-induced Regeneration in Root Segments of White Poplar (*P. alba* L.). **In Vitro**, v. 13, n. December 2016, p. 623–626. 2007.

URANBEY, S. et al. Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 1, p. 53–57. 2005.

VALVEKENS, D.; MONTAGU, M.; LIJSEBETTENS, M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 15, p. 5536–40. 1988.

VINOCUR, B. et al. Enhanced bud regeneration in aspen (*Populus tremula* L.) roots cultured in liquid media. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 12, p. 1146–1154. 2000.

WANG, H. M. et al. Effects of Thidiazuron, basal medium and light quality on adventitious shoot regeneration from in vitro cultured stem of *Populus alba* x *P. berolinensis*. **Journal of Forestry Research**, v. 19, n. 3, p. 257–259. 2008.

YADAV, R. et al. High frequency direct plant regeneration from leaf, internode, and root segments of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides*). **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, n. 3, p. 175–182. 2009.

## 8 VALIDAÇÃO DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE *Eucalyptus grandis* EM *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 E *Nicotiana tabacum*

### RESUMO

A crescente demanda por produtos florestais utilizados como matéria-prima torna necessário o desenvolvimento de espécies mais tolerantes a estresses. Para tal, é fundamental a identificação, isolamento e validação de genes e promotores de interesse. Portanto, neste capítulo, foi realizada a transformação genética de *Populus* e *Nicotiana tabacum* com promotores específicos de raiz isolados de *Eucalyptus grandis*, não descritos em literatura, com o objetivo de validá-los. Foram utilizadas raízes como explantes para o híbrido *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4, que foi transformado com os plasmídeos pCAMBIA 1303 B21 e pCAMBIA 1303 A09, contendo os promotores *Eucgr.G02172* e *Eucgr.C00918*, respectivamente. Para *Nicotiana tabacum*, foram utilizados explantes foliares os quais foram transformados com o plasmídeo pCAMBIA 1303 A09. O promotor *Eucgr.G02172* é composto por um domínio protéico característico de proteínas responsivas a estresses enquanto que o *Eucgr.C00918* não apresenta homologia com outro gene dentre as angiospermas. Foram confirmados por PCR 15 eventos transgênicos de *Nicotiana tabacum*, porém nas 3 plantas submetidas ao teste histoquímico de GUS, não foi observada a expressão do gene. A ausência da expressão do gene *gus* pode ser atribuída a diversos fatores, como por exemplo, a distância evolutiva à *Eucalyptus grandis*, que pode ter resultado na ausência de fatores de transcrição necessários para a ativação do promotor. Com relação aos experimentos realizados com o plasmídeo pCAMBIA 1303 A09 em *Populus*, foi obtido um evento até o momento. Já com o plasmídeo pCAMBIA 1303 B21, foram confirmadas 20 plantas transformadas. Não foi observada a expressão do gene *gus* em 2 eventos transgênicos submetidos ao teste histoquímico, enquanto que no terceiro a expressão ocorreu em parte da folha e do pecíolo. Os resultados obtidos para o perfil de expressão em *Populus* não são definitivos, pois os genes sob controle destes promotores foram isolados de plantas de *E. grandis* adultas, sendo necessária a repetição do teste histoquímico após a transferência das plantas para casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Transformação genética. Plantas modelo. Expressão órgão-específica. Genômica funcional.

**VALIDATION OF ROOT-SPECIFIC PROMOTERS FROM *Eucalyptus grandis*  
IN *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 AND *Nicotiana tabacum***

**ABSTRACT**

The growing demand for forest products used as raw material makes necessary the development of stress-tolerant commercial species, for this, it is fundamental the identification, isolation and validation of genes and promoters of interest. Therefore, in this chapter, the genetic transformation of *Populus* and *Nicotiana tabacum* with root-specific promoters isolated from *Eucalyptus grandis*, not described in the literature, was carried out, with the purpose of validate them. Roots were used as explants for hybrid *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4, which was transformed with the plasmids pCAMBIA 1303 B21 and pCAMBIA 1303 A09 that contain the promoters *Eucgr.G02172* and *Eucgr.C00918*, respectively. For *Nicotiana tabacum*, leaf explants were transformed with the plasmid pCAMBIA 1303 A09. The *Eucgr.G02172* promoter is composed of a protein domain characteristic of stress responsive proteins whereas *Eucgr.C00918* does not show homology with another gene among the angiosperms. Fifteen transgenic events of *Nicotiana tabacum* were confirmed with PCR, but in the 3 plants submitted to the histochemical test of GUS, the expression of the gene was not observed. The absence of *gus* gene expression can be attributed to several factors, such as the evolutionary distance to *Eucalyptus grandis* that may have resulted in the lack of transcription factors required for promoter activation. In the experiments performed with the plasmid pCAMBIA 1303 A09 in *Populus*, one event was obtained until now. With the plasmid pCAMBIA 1303 B21, 20 transformed events were obtained. The expression of the *gus* gene was not observed in 2 transgenic events submitted to the histochemical test, whereas in the third the expression occurred in part of the leaf and the petiole. The results obtained for the expression profile in *Populus* are not definitive because the genes under control of these promoters were isolated from *E. grandis* adult plants, requiring the repetition of the histochemical test after the transfer of the plants to greenhouse.

**Key-words:** Genetic transformation. Model plants. Organ-specific expression. Functional genomics.

## 9 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos florestais utilizados como matéria prima nas indústrias madeireiras, na produção de celulose, bioenergia e outros, devido ao constante aumento populacional, têm pressionado para o desenvolvimento de plantas com maior produtividade, utilizando menores áreas, visando desta maneira também reduzir o impacto ambiental causado pela exploração e desmatamento em florestas nativas. Isso demonstra a importância dos estudos com espécies florestais para diversas finalidades, incluindo a biotecnologia e mais especificamente a genômica funcional, desempenhando papel crucial na elucidação da função de genes de interesse (NEALE; KREMER, 2011).

Dentre as características desejadas objetiva-se principalmente o aumento na biomassa e modificação no conteúdo de lignina, porém, outros estudos de grande interesse envolvem o uso na fitorremediação e o desenvolvimento de organismos com maior tolerância a estresses bióticos e abióticos (GIRIJASHANKAR, 2011). Para tal, é necessária a identificação, isolamento e validação da função de genes expressos sob determinadas condições, para que possam atender aos objetivos propostos.

Além da expressão em condições específicas, como estresses, certos genes são expressos somente em alguns tecidos ou órgãos, como folhas ou raízes. A identificação destes permite também o uso de suas regiões promotoras que conduzem a este padrão de expressão. Promotores específicos, que delimitam a expressão a certos locais na planta, podem ser utilizados para restringir a expressão de outros genes apenas nestes tecidos, fornecendo uma ampla variedade de aplicações (SHAH et al., 2015).

Em um estudo desenvolvido na Embrapa Florestas por Grunennvaldt (2014) foram identificados e isolados genes preferencialmente expressos nas raízes de *Eucalyptus grandis*, a partir de dados de RNA-Seq gerados de bibliotecas de folha, caule e raiz, de três genótipos de eucalipto.

Os genes foram escolhidos baseados nos níveis de expressão, devendo estar entre os 20 mais expressos no órgão e ainda não apresentando descrição em literatura. A partir disso, dois destacaram-se: *Eucgr.G02172* e *Eucgr. C00918*. O gene *Eucgr. G02172*, se enquadrou entre os 6 mais expressos em raiz e é composto por um domínio protéico característico de proteínas responsivas a estresses

(Pathogenesis-related protein) da família *Bet v 1*. Diferentemente, o gene *Eucgr. C00918* não apresenta homologia com outro gene dentre angiospermas, acreditando-se que possa ser exclusivo de *Eucalyptus* (GRUNENVALDT, 2014).

O uso de promotores específicos de raiz apresenta grande potencial, pois podem ser aplicados na biorremediação de solos contaminados, proteção contra a seca, aumento da tolerância à sais, absorção de macro e microelementos e no aumento da resistência à patógenos de raízes (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN 2004). Em estresses como hídrico e salino, por exemplo, ocorrem uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e metabólicas nas plantas, afetando a expansão celular, síntese de proteínas e fotossíntese, reduzindo o crescimento e produtividade (ALTMAN, 2003). Conseqüentemente, o desenvolvimento de plantas mais tolerantes à falta de água, devido aos longos períodos de seca enfrentados em diversos países, têm sido de grande interesse.

A expressão de um gene somente no local em que é necessário, evita possíveis efeitos adversos frequentemente encontrados na expressão constitutiva de genes de tolerância a estresses e respostas de defesa. Dentre as características indesejáveis encontradas cita-se crescimento e desenvolvimento alterados, morfologia anormal e gasto metabólico (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Portanto, objetivou-se neste trabalho a validação de dois promotores raiz-específicos de *Eucalyptus grandis*, *Eucgr. C00918* e *Eucgr. G2172*, nas plantas modelo *Populus tremula x Populus alba* clone 717-1B4 e *Nicotiana tabacum*. Com o intuito de, se validados, poderão ser utilizados na produção de plantas de *Eucalyptus* transgênicas com maior tolerância à seca, com expressão do transgene exclusivamente em suas raízes.

## 10 MATERIAL E MÉTODOS

### 10.1 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Nicotiana tabacum* E *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4

Sementes de *Nicotiana tabacum*, cultivar Petit Havana SR-1, cedidas pelo IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná), foram submetidas à assepsia sendo imersas em hipoclorito de sódio 10% durante 20 minutos, em seguida em álcool 70% por 1 minuto e lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada. Para germinação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25  $\pm$  2°C. Foram utilizados como explantes discos foliares com aproximadamente 1 cm de diâmetro, retirados da nervura central das folhas de plantas com 30 dias.

Plantas *in vitro* de *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Gilles Pilate, INRA, França. Para os experimentos de transformação genética foram utilizados como explantes segmentos de raízes de aproximadamente 2 cm, com 5 meses desde a última repicagem, cortadas com auxílio de bisturi. Estas foram isoladas de plantas do clone 717-1B4, micropropagadas através de segmentos nodais, contendo duas gemas axilares, em frascos com 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro, contendo meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. A formação de raízes ocorre naturalmente no meio de micropropagação.

As plantas micropropagadas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25  $\pm$  2°C. O pH de todos os meios de cultura utilizados foi ajustado para 5,8 e estes foram autoclavados a 120°C e 1 atm durante 20 minutos.



uma cubeta de 1 mm e submetido a eletroporação a 2500 V em aparelho Eporator<sup>®</sup> (Eppendorf). Após o pulso elétrico, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido (LURIA-BERTANI, composto por 10 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, 10 g L<sup>-1</sup> de triptona e 5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) na cubeta e o conteúdo foi pipetado para microtubo de 1,5 mL, sendo em seguida mantido sob agitação em shaker a 37°C a 225 rpm durante 1 hora. As células foram plaqueadas em meio LB sólido seletivo contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. As placas foram levadas para estufa a 37°C, sendo mantidas até o surgimento de colônias (aproximadamente 16 horas). Colônias de *E.coli* foram coletadas com o auxílio de ponteiros estéreis e colocadas em tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio LB líquido e 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. Os tubos foram mantidos pelo período de 16 horas sob agitação em shaker a 37°C a 225 rpm.

Após este período, o DNA plasmidial, introduzido nas células de *E. coli* foi extraído utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps (Promega) e introduzido na *Agrobacterium tumefaciens* através de eletroporação. Foi utilizado 1 µL do DNA plasmidial para uma alíquota de 40 µL de células de *A. tumefaciens*. Após o pulso elétrico, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido na cubeta, o conteúdo foi pipetado para microtubo de 1,5 mL e mantido sob agitação em shaker a 28°C, 125 rpm durante 2 horas. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina e as placas foram mantidas em estufa a 28°C até o surgimento de colônias (aproximadamente 48 horas).

Colônias de *A. tumefaciens* foram coletadas com o auxílio de ponteiros estéreis e colocadas em tubos falcon de 15 mL contendo 3 mL de meio LB líquido e 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. Os tubos foram mantidos pelo período de 16 horas sob agitação em shaker a 28°C a 125 rpm. Posteriormente, 850 µL da solução crescida em cada tubo Falcon foram pipetados em 3 microtubo de 1,5 mL juntamente com 150 µL de glicerol 80% em cada, sendo vortexados até completa homogeneização. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior uso nos experimentos de transformação genética.

A presença da região promotora (1 kb) nas bactérias foi confirmada por PCR em termociclador (Applied Biosystems, Veriti, 96 Well Thermal Cycler). Foram utilizados os primers do promotor *Eucgr. C00918*: (5'-GAATTCAAATAAAGCGAGAACAATGTCGATGCGCT – 3' e 5'-AGATCTACCATGAAAGCTTCTCCGGGAGTCCTATCCTGTC – 3').

Para a reação de amplificação foram utilizados: 0,5 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada); 1 µL de Taq polimerase para um volume final de 25 µL. O seguinte programa de temperatura foi utilizado: 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 min, 62°C por 1min, 72°C por 1min; 72°C por 7 min e 4°C até a retirada das amostras.

Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

## 10.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum* COM O PLASMÍDEO PCAMBIA 1303 A09

Uma alíquota de *Agrobacterium tumefaciens*, mantida em estoque em glicerol em freezer -80°C, foi descongelada em gelo e inoculada em erlenmeyer de 150 mL contendo 25 mL de meio LB líquido e 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. A bactéria foi cultivada sob agitação em shaker a 28°C a 125 rpm durante aproximadamente 16 horas, até atingir densidade ótica adequada DO<sub>600</sub>= 0,5-1,0, determinada em espectrofotômetro.

A suspensão bacteriana foi pipetada em microtubo de 1,5 mL e centrifugada em centrífuga (5424 - Eppendorf) a 12.230 xg durante 10 minutos para formação do pellet bacteriano. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio MS/2 líquido. Em placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, foram adicionados 20 mL de meio INFTAB líquido (BRASILEIRO, 1998 - composto pelos sais MS, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 1 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de biotina) e 200 µL da solução bacteriana. Os explantes foram imersos na solução, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas pelo período de 48 h no escuro em BOD a 23°C.

Após este período, os explantes foram lavados 2 vezes com meio INFTAB líquido e inoculados com a face adaxial em contato com o meio INFTAB sólido (mesma composição do meio INFTAB líquido acrescido de 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 7g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, 250 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina e 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina).

Os explantes foram repicados a cada 15 dias para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Ao atingirem aproximadamente 2 centímetros, foram

passados para frascos de 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro contendo meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico e 15 mg L<sup>-1</sup> de higromicina.

Foram realizadas 2 replicatas, o experimento 1 foi composto de 125 e o experimento 2 de 100 explantes.

### 10.3 ACLIMATIZAÇÃO

Foram aclimatizados 9 eventos transgênicos de *Nicotiana tabacum*, com 3 repetições, sendo obtidas no total 27 plantas. Para cada repetição foi aclimatizada também uma planta de tabaco não transformada.

Em cada frasco contendo as plantas cultivadas em meio MS, foram adicionados 10 mL de água autoclavada e estes permaneceram 48 horas com as tampas entreabertas.

Após este período, as raízes das plantas foram lavadas para retirada do meio de cultura, sendo posteriormente transplantadas para vasos de 1,7 L contendo substrato Agrinobre TNMIX autoclavado. Os vasos foram transferidos para casa de vegetação, sendo regados a cada 48 horas. Após 30 dias foi avaliada a taxa de sobrevivência.

### 10.4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 COM OS PLASMÍDEOS pCAMBIA 1303 A09 E B21

Uma alíquota de *Agrobacterium tumefaciens*, mantida em estoque em glicerol em freezer -80°C, foi descongelada em gelo e inoculada em erlenmeyer de 150 mL contendo 25 mL de meio LB líquido e 50 mg L<sup>-1</sup> de canamicina. A bactéria foi cultivada sob agitação em shaker a 125 rpm, 28°C durante aproximadamente 16 horas, até atingir densidade ótica adequada DO<sub>600</sub>= 0,5-1,0, determinada em espectrofotômetro.

A suspensão bacteriana foi pipetada em microtubo de 1,5 mL e centrifugada em centrífuga (5424 - Eppendorf) a 12.230 xg durante 10 minutos para formação do pellet bacteriano. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio MS/2 líquido. A solução foi transferida para frasco com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro juntamente com 50 mL de meio MS/2.

Como explantes, foram utilizadas raízes com 4 meses de idade para o experimento com o plasmídeo pCAMBIA 1303 B21 e com 6 meses de idade para o experimento com o plasmídeo pCAMBIA 1303 A09. Estas foram então cortadas em segmentos de aproximadamente 2 cm, com o auxílio de bisturis e colocadas em contato com a solução. Os frascos foram vedados com filme de PVC, levados ao aparelho de ultrassom e posteriormente, os explantes foram mantidos em co-cultivo líquido por 30 minutos. Após este período, os explantes foram secos em papel filtro autoclavado e transferidos para placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo meio WPM com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, sem a adição de antibióticos. As placas foram levadas para BOD com temperatura de 23°C aonde permaneceram por 48 horas, para co-cultivo adicional no escuro.

Após este período, os explantes foram transferidos para meio de indução de brotações WPM com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico, 14 µM de zeatina, 250 mg L<sup>-1</sup> de amoxicilina, para eliminar a *Agrobacterium*, e 1 mg L<sup>-1</sup> de higromicina para seleção e foram levados para sala de crescimento. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2°C.

Os explantes foram repicados a cada 15 dias para novo meio de cultura, nas mesmas condições. Brotos com aproximadamente 2 cm foram isolados das raízes e colocados em frascos com 13,5 cm de altura e 8 cm de diâmetro contendo 50 mL de meio MS, para alongamento e enraizamento, com a adição de 1 mg L<sup>-1</sup> de higromicina.

## 10.5 ANÁLISE MOLECULAR DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 E *Nicotiana tabacum*

### 10.5.1 Extração de DNA e PCR

Para *Nicotiana tabacum*, a extração de DNA foi realizada para 15 eventos putativos, mais um controle negativo (planta de tabaco não transformada), para os dois experimentos. Para *Populus*, foi realizado para uma média de 10 eventos de cada tratamento, mais um controle negativo (planta de *Populus* não transformada).

Folhas (150 mg) provenientes dos eventos transformados putativos mantidos *in vitro* foram maceradas em microtubo de 2 mL contendo 3 *beads* de tungstênio em cada em macerador automático Tissue Lyser® (Qiagen). Para extração de DNA foi utilizado o protocolo CTAB 2% (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

As amostras foram submetidas à reação de PCR para amplificação da sequência do gene repórter *gus* de 400 pb. O seguinte programa de temperatura foi utilizado: 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Para confirmação da presença da região promotora *Eucgr. G02172* em *Populus* as amostras foram submetidas à PCR, com os primers: 5'-AGCTGAGCATCGAGTACGAGAAGT-3' e 5'-TGCGCTTGAAACGTGAGCATC-3, nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e ciclo final de 72°C por 7 minutos. Para as reações de amplificação foram utilizados: 0,3 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada); 1 µL de Taq polimerase para um volume final de 25 µL.

Para confirmação da presença da região promotora *Eucgr. C00918* em *Populus* e tabaco as amostras foram submetidas à PCR. Foram utilizados primers do promotor *Eucgr. C00918*: (5'-GAATTCCAAATAAAGCGAGAACAATGTCGATGCGCT – 3' e 5'-AGATCTACCATGAAAGCTTCTCCGGGAGTCCTATCCTGTC – 3'). Para a reação de amplificação foram utilizados: 0,3 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada); 1 µL de Taq polimerase para um volume final de 25 µL. O seguinte programa de temperatura foi utilizado: 94°C por 4 min, seguido por 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 min, 62°C por 1min, 72°C por 1min; 72°C por 7 min e 4°C até a retirada das amostras.

Como controles positivos foram utilizados os plasmídeos, extraídos por MiniPrep de *Escherichia coli*, mantidos em freezer a -20°C, submetidos à PCR com os respectivos primers das regiões promotoras. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

### 10.5.2 Teste histoquímico de GUS

A análise da expressão do gene *gus* foi realizada por meio da reação histoquímica catalisada pela enzima  $\beta$ -glucuronidase na presença do tampão X-gluc. Plântulas de *Populus* transgênicas mantidas *in vitro* e folhas e raízes de plantas de tabaco transgênicas mantidas em casa de vegetação, após 60 dias, foram imersas em solução tampão composta por 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA.H<sub>2</sub>O, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 250  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo e incubados a 37°C por 16 h. Após este período, os explantes foram colocados em etanol 70% para eliminação da clorofila. A avaliação da expressão do gene *gus* foi visual e foi considerada positiva quando o tecido apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul. Como controle positivo foram utilizadas plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o plasmídeo pCAMBIA 1303 sob controle do promotor CAMV35S.

Para *Nicotiana tabacum* e *Populus* 3 eventos transgênicos confirmados por PCR para a região do gene *gus*, com 60 dias em casa de vegetação e 30 dias *in vitro* respectivamente, foram submetidos ao teste.

## 10.6 AVALIAÇÕES

Aos 30 dias após a transformação genética, foi avaliado o número total de eventos putativos transformados de *Nicotiana tabacum*. Para *Populus* foram avaliados o número de brotos por tratamento aos 30 e 60 dias.

Para ambos foi calculada a eficiência de seleção através do número de eventos com presença do gene *gus* confirmada por PCR dentre o número total de brotos avaliados em cada tratamento.

## 11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

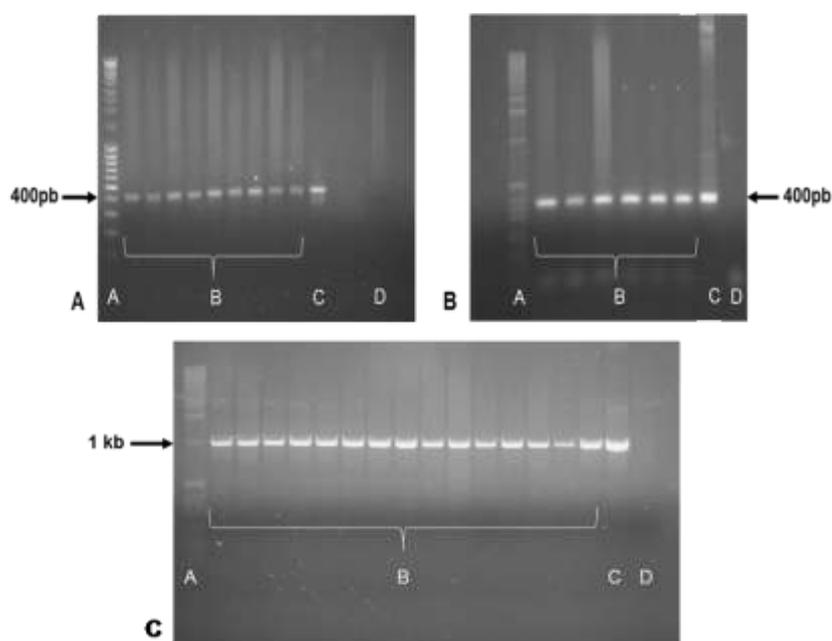
### 11.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Nicotiana tabacum* com O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09

Foram obtidos 122 eventos transformados putativos. A presença da região do promotor *Eucgr.C00918* e do gene *gus* foi confirmada nos 15 eventos avaliados por PCR (FIGURA 10). Foi obtida uma eficiência de seleção de 100%, considerando

os eventos avaliados e a taxa de sobrevivência das plantas aclimatizadas e transplantadas para vasos, mantidas em casa de vegetação, foi de 96,2%.

Os eventos de *Nicotiana tabacum* em casa de vegetação não apresentaram alterações morfológicas visuais, exceto o evento 1, no qual foram observadas alterações fenotípicas foliares (áreas sem pigmentação) (FIGURA 11). O fenótipo encontrado pode ser um resultado do local de inserção do T-DNA no genoma da planta, o qual pode ter ocorrido na região de genes que codificam enzimas envolvidas na rota biossintética da clorofila. Se a inserção do gene ocorrer dentro ou próxima à um gene ou elemento de regulação endógeno, tanto a expressão do gene quanto a proteína produzida podem ser afetados resultando em uma característica não intencional (SCHNELL, 2015).

FIGURA 10 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO GENE *gus* DE 400pb E DA REGIÃO PROMOTORA *Eucgr. C00918* DE 1 KB COM DNA DE *Nicotiana tabacum* TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09



**A.** A. Marcador de peso molecular (Ladder 10 kb). B. Eventos 1 A 9. C. Controle positivo: plasmídeo pCAMBIA 1303 A09 D. Controle negativo. **B.** Marcador de peso molecular (Ladder 1 kb). B. Eventos 10 a 15. C. Controle positivo: plasmídeo pcambia 1303 A09 D. Controle negativo. **C.** A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 kb). B. Eventos 1 a 15. C. Controle positivo: plasmídeo pCAMBIA 1303 A09 D. Controle negativo. FONTE: O autor (2016)

FIGURA 11 - EVENTOS DE *Nicotiana tabacum* TRANSFORMADOS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09 EM VASOS EM CASA DE VEGETAÇÃO AOS 15 E 30 DIAS E CONTROLE NÃO TRANSFORMADO AOS 30 DIAS



A. Evento 1 com alterações fenotípicas nas folhas aos 15 dias. B. Evento 1 com alterações fenotípicas nas folhas aos 30 dias. C. Controle não transformado aos 30 dias. FONTE: O autor (2016).

Não foi observada expressão do gene *gus* nas folhas e raízes dos 3 eventos de *Nicotiana tabacum* submetidos ao teste de histoquímico de GUS aos 60 dias em casa de vegetação (FIGURA 12). No entanto, o teste deverá ser realizado para todos os eventos para verificar se esta característica se mantém.

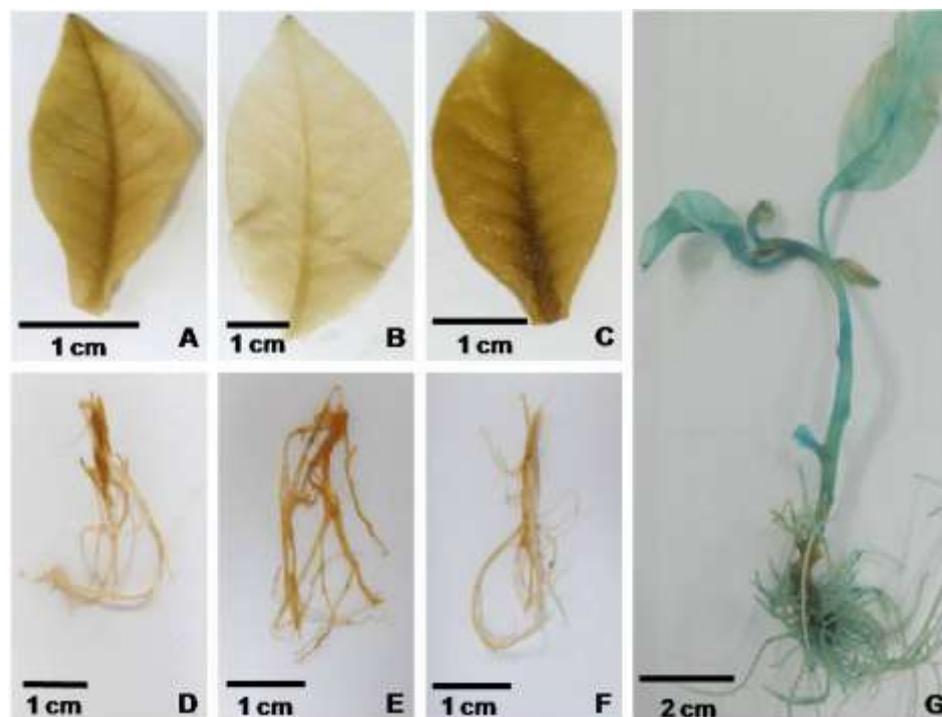
As plantas transformadas nem sempre apresentam uma expressão adequada do transgene e devido à complexidade das células vegetais e algumas limitações da engenharia genética, características não intencionais podem ser encontradas. Com frequência são descritos casos nos quais os genes são expressos em níveis variáveis, o que nem sempre está relacionado ao número de cópias inserido no genoma. Diferentes perfis de expressão podem também ser uma consequência de mudanças no DNA como, por exemplo, deleções, inserções e rearranjos ocorridos tanto na transformação genética ou associada à cultura de tecidos (GELVIN, 2003; SCHNELL, 2015).

A ausência da expressão do gene *gus* neste trabalho pode ter ocorrido pelo fato de que promotores removidos do seu local nativo e fusionados a novos genes, podem conduzir a uma expressão diferente da esperada. Alguns fatores que podem ocasionar este resultado são: a ausência de fatores de transcrição, neste caso, a espécie *Nicotiana tabacum* é evolutivamente distante de *Eucalyptus*, podendo não conter os fatores de transcrição necessários para a ativação do promotor. Além disso, o local de integração do gene no genoma ocorre de forma aleatória, e interações *trans*, como os fatores de transcrição, podem não ocorrer dependendo do local de integração do gene (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004).

Outros fatores, citados por Potenza, Aleman e Sengupta-Gopalan (2004), podem ser considerados: tipo, tamanho e posição de *enhancers* e *silencers* no promotor e também próximos à região do transgene. Os *enhancers* podem estar localizados a centenas ou milhares de pares de base de distância do gene que controlam, portanto, quanto maior a distância destes elementos na sequência, maior a possibilidade de sua eliminação durante a clonagem do promotor, impedindo ou reduzindo a sua ativação.

A região promotora e seus elementos *cis* regulatórios são essenciais para o processo de transcrição. Por isso, entre outros aspectos, o conhecimento dos elementos *cis* regulatórios é fundamental no entendimento da regulação de um determinado gene (WANG; HABERER; MAYER, 2009). No entanto, os elementos *cis* são pequenas sequências de DNA, que contém 5 a 20 nucleotídeos e devido ao seu tamanho, a identificação destes elementos é uma tarefa difícil (ROMBAUTS et al., 2003).

FIGURA 12 - FOLHAS E RAÍZES DE 3 EVENTOS DE *Nicotiana tabacum* TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09 SUBMETIDOS AO TESTE DE GUS AOS 60 DIAS EM CASA DE VEGETAÇÃO E PLANTA DE *Nicotiana tabacum* UTILIZADA COMO CONTROLE POSITIVO



A, B e C. Folhas dos eventos 1, 2 e 3 de *Nicotiana tabacum*. D, E e F. Raízes dos eventos 1, 2 e 3 respectivamente. G. Controle positivo (planta de *Nicotiana tabacum* transformada com o plasmídeo pCAMBIA 1303). FONTE: O autor (2016).

Uma especificidade diferente da esperada já foi observada por outros autores na literatura para outras espécies. Hattori et al. (1990) realizaram um estudo com dois promotores específicos da raiz tuberosa da batata doce. Estes coordenam a expressão de genes que codificam a enzima  $\beta$ -amilase e esporamina. O promotor do gene gSPO-A1, que codifica a esporamina, foi introduzido no tabaco fusionado ao gene repórter CAT, o qual apresentou expressão também nos caules da planta. Esta expressão foi contida com uma deleção em -305 pb e totalmente anulada com uma deleção em -94 pb. Maeo et al. (2001) realizaram um estudo semelhante com o promotor do gene da  $\beta$ -amilase. Ao ser introduzido fusionado ao gene *gus* em plantas de tabaco, a expressão também ocorreu nos caules da planta. Esta expressão foi eliminada com uma deleção em -785 pb.

Um outro exemplo, é o estudo realizado por Faktor et al. (1996), com genes que codificam enzimas chalcona sintase, os quais estão envolvidos na produção de flavonóides. O promotor do gene da chalcona sintase 15 do feijão (CHS15) foi fusionado ao gene *gus* e sua expressão ocorreu nas células epidérmicas das pétalas, extremidades das raízes e nos meristemas das raízes laterais da planta. Estudos com o promotor realizados em plantas de tabaco demonstraram que a presença de dois elementos *cis* próximos ao TATA box são essenciais para uma expressão alta e pétala-específica deste gene e através de estudos mais aprofundados, foi descoberto que a expressão depende dos dois elementos, sendo influenciada também pela distância entre eles.

Estes resultados demonstram que através de deleções na sequência do promotor é possível a obtenção de diferentes perfis de expressão quando introduzidos em outras plantas. A ausência da expressão do gene *gus* em tabaco, talvez possa ser solucionada com novas sequências do promotor *Eucgr.C00918*, desde que esta não tenha ocorrido pela falta de fatores de transcrição devido à distância evolutiva entre as espécies.

Outra possibilidade para a ausência na expressão do gene *gus* é o silenciamento deste, o qual pode ocorrer através da metilação do DNA, degradação dos transcritos e fragmentação ou rearranjo do plasmídeo antes da integração (BATTEW; HALL, 1990; RAJEEVKUMAR; ANUNANTHINI; SATHISHKUMAR, 2015).

Em um estudo realizado por Li et al. (2001) foi observado o silenciamento do gene *gus* em 25% das plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas, o qual foi

atribuído à metilação do promotor CAMV35S. Outro exemplo de silenciamento do ocasionado por metilação foi descrito por Zhu, Hughes e Huang (1991). Os autores observaram que alguns calos de *Nicotiana tabacum* contendo o gene *nptII* não apresentaram resistência ao antibiótico canamicina devido a uma metilação no promotor.

Além da metilação, a inserção de múltiplas cópias do transgene pode levar a perda da função de algumas ou todas elas. Em um estudo realizado por Li et al. (2002) dentre 20 eventos de *Nicotiana tabacum* obtidos, em 6 deles houve silenciamento do gene *gus*. Foi observado também nas plantas nas quais não foi encontrada expressão do gene *gus* a presença de 3 a 4 cópias do gene e nas plantas com alta expressão do gene haviam 2 ou 1. O silenciamento devido à integração de várias cópias pode ocorrer devido ao pareamento das sequências repetidas.

Apesar de frequentemente não ser encontrada a especificidade desejada, diversos trabalhos publicados descrevem o uso com sucesso de promotores específicos de raiz fusionados à outros genes e utilizados na transformação genética. Como por exemplo, o estudo realizado por Xiao et al., (2005) no qual foram isolados os promotores dos genes *mtpt1* e *mtpt* de *Medicago truncatula* (codificadores de proteínas transportadoras de fosfato) que foram ligados aos genes repórteres *gus* e *gfp*. A expressão dos transgenes em *Arabidopsis thaliana* foi similar à planta nativa e demonstrando que os dois promotores são raiz-específicos e induzidos por fósforo.

Em outro trabalho, realizado por Liu e Ekramoddoullah (2003), foi isolado o promotor PmPR10-1.14, do gene *pr10* de *Pinus*, o qual foi validado em *Nicotiana tabacum*. Nesta planta, o promotor dirigiu a uma expressão raiz-específica do gene *gus*. Filichkin et al. (2006) isolaram o promotor ET304 do híbrido *Populus tremula* x *Populus alba* e caracterizaram seu padrão de expressão em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* e *Populus*. Através do ensaio histoquímico do gene *gus* foi observada sua expressão predominante em raízes.

Além destes, outros promotores raiz-específicos já foram descritos em literatura: TobRB7 do tabaco (YAMAMOTO et al., 1991), Pyk10 de *Arabidopsis thaliana* (NITZ, et al., 2001), GmTIP da soja (CHEN et al., 2015), FaRB7 do morango (VAUGHAN et al., 2006) os quais tiveram sua especificidade validada.

## 11.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 771-1B4 COM OS PLASMÍDEOS pCAMBIA 1303 A09 E pCAMBIA 1303 B21

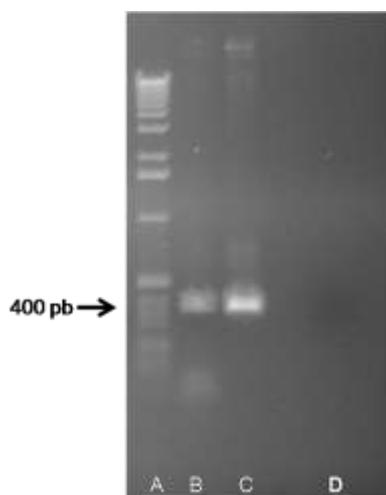
No experimento de transformação genética com o plasmídeo pCAMBIA 1303 A09 foi obtido um número médio de brotos de 63 aos 30 dias e 85 aos 60 dias. Até o momento foi confirmada uma planta transgênica dentre 2 submetidas à PCR com os *primers* das regiões do gene *gus* (FIGURA 13). Um maior número de amostras será submetido às análises de biologia molecular assim que atingirem tamanho suficiente para extração de DNA.

No experimento de transformação genética com o plasmídeo pCAMBIA 1303 B21 foram obtidos 37 brotos aos 30 dias e 130 aos 60 dias. Foram obtidos até o momento 19 eventos transgênicos dentre 27 avaliados com presença confirmada do gene *gus* (FIGURA 14). Os outros brotos estão em meio de multiplicação até atingirem tamanho suficiente para extração de DNA e confirmação por PCR.

Para avaliar se a expressão do gene *gus* fusionado ao promotor *Eucgr.G02172* era raiz-específica, foi realizado o teste histoquímico de GUS com plantas de 3 eventos mantidos *in vitro*. No entanto não foi observada expressão do gene *gus* em 2 dos eventos transgênicos confirmados que foram submetidos ao teste. No terceiro, foi observada expressão em parte da folha e do pecíolo (FIGURA 15).

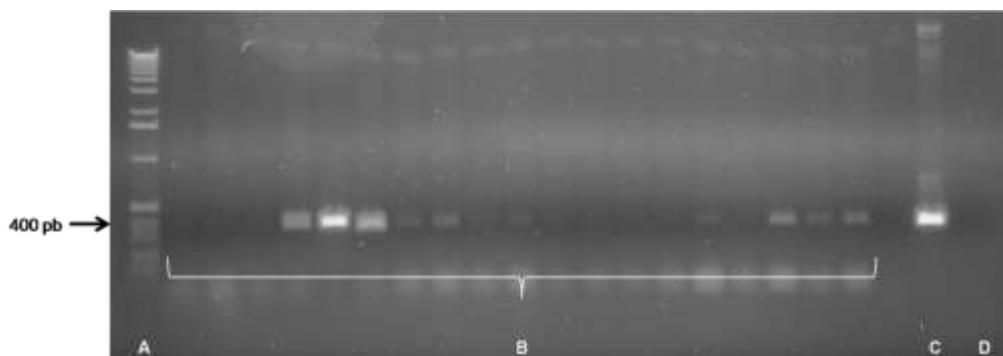
A fraca/ausente expressão do gene em *Populus* pode ter ocorrido pelo fato de que o gene dirigido por este promotor foi isolado de plantas de *Eucalyptus grandis* adultas, sendo necessário aguardar a transferência das plantas para casa de vegetação e realizar novamente o teste histoquímico.

FIGURA 13 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 A09



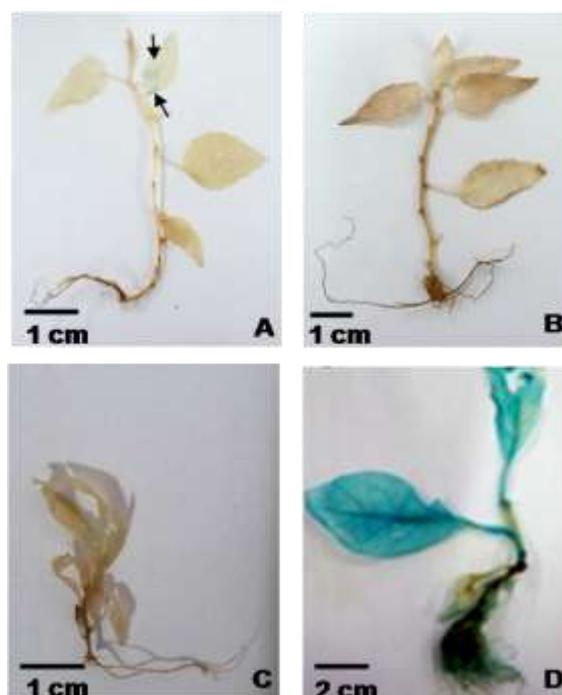
A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Evento 1 de *Populus tremula* X *Populus alba*. C. Controle positivo: plasmídeo CAMBIA 1303 A09 D. Controle negativo. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 14 - ELETROFORESE DOS PRODUTOS DE PCR REALIZADO COM OS PRIMERS DA REGIÃO DO GENE *gus* DE 400pb COM DNA DE *Populus tremula* x *Populus alba* CLONE 717-1B4 TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21



A. A. Marcador de peso molecular (Ladder 1 KB). B. Eventos 1 a 19 de *Populus tremula* X *Populus alba*. C. Controle positivo (plasmídeo pCAMBIA 1303 B21) D. Controle negativo. FONTE: o autor (2017)

FIGURA 15 - PLANTAS DE *Populus tremula x Populus alba* CLONE 717-1B4 TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303 B21 SUBMETIDAS AO TESTE DE GUS E CONTROLE POSITIVO DE *Nicotiana tabacum* TRANSFORMADO COM O PLASMÍDEO pCAMBIA 1303



A. Planta de *Populus tremula x Populus alba* clone 717-1B4 transformada com o plasmídeo pCAMBIA B21 com expressão do gene *gus* em parte da folha e pecíolo (indicadas pelas setas). B e C. Plantas de *Populus tremula x Populus alba* clone 717-1B4 transformadas com o plasmídeo pCAMBIA B21 não apresentando expressão do gene *gus*. D. Controle positivo de *Nicotiana tabacum* transformado com o plasmídeo pCAMBIA 1303 sob controle do promotor 35S

Um perfil variável na atividade de um promotor em função do estágio de desenvolvimento da planta já foi observado por outros autores. Em um estudo realizado por Brandalise (2007) promotores tecido-específicos de raízes e folhas de café foram isolados e caracterizados em *Nicotiana tabacum*. Ao analisar plantas transformadas com o promotor raiz-específico, foi observada uma expressão do gene *gus* nas regiões epicotiledonar e hipotiledonar nos estágios iniciais de desenvolvimento. No entanto, o perfil de atividade do promotor mudou após o terceiro par de folhas, no qual nenhuma expressão do gene *gus* foi observada. O autor atribuiu este resultado a uma incorreta regulação do sistema transcricional nos estágios iniciais de desenvolvimento das plântulas.

Lee e Korban (2002) conduziram um estudo no qual foi analisada a regulação transcricional do gene *atpcs1* em vários estágios do desenvolvimento de *Arabidopsis*, através da fusão do promotor deste com o gene repórter *gus*. Foi observado um aumento na atividade do promotor, evidenciada pela expressão do gene *gus*, a qual caiu quando as plantas alcançaram 15 dias.

Portanto, o diferente perfil de expressão dos genes devido à regulação transcricional ao longo dos estágios de desenvolvimento pode explicar o motivo pelo qual o gene *gus* não foi expresso em dois eventos e apresentou fraca expressão no terceiro.

## 12 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que em *Nicotiana tabacum* o promotor *Eucgr.C00918* provavelmente não é ativado, sendo assim não apresenta a especificidade esperada. Com relação à *Populus* o promotor *Eucgr.G02172* conduz a uma expressão do gene *gus* fraca/ausente em plantas mantidas *in vitro*. É necessária a repetição do teste histoquímico após a transferência das plantas para casa de vegetação, pois os genes dirigidos por estes promotores foram isolados de plantas de *Eucalyptus grandis* adultas.

### 13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram desenvolvidos protocolos de transformação genética e organogênese de *Populus tremula* x *Populus alba* clone 717-1B4 utilizando raízes como explantes, compreendendo o primeiro de organogênese descrito para este clone e o primeiro de transformação genética para o gênero *Populus*. Foi observado que as raízes são explantes potenciais tanto para a organogênese quanto para a transformação genética, pois são de fácil manipulação, apresentam baixa oxidação e um bom potencial regenerativo. No entanto, pelo fato de este ser um estudo inicial, são necessários novos experimentos para otimização dos protocolos aqui desenvolvidos. Indica-se para estudos futuros a utilização de concentrações de BAP inferiores a 2,2  $\mu\text{M}$ , avaliar a resposta das raízes quando submetidas a outras citocininas, como por exemplo o TDZ, e também o meio MS líquido.

Com relação aos estudos realizados com o intuito de validar os promotores específicos de raiz isolados de *E. grandis*, em *Nicotiana tabacum* não foi observada a atividade esperada. Quanto ao *Populus*, ainda não se pode afirmar sobre o perfil de atividade dos dois promotores. Porém, se validados em *Populus*, compreenderão uma descoberta de grande valia para a transformação genética de espécies florestais de interesse, como *Eucalyptus*, pelo fato de restringir a expressão dos genes apenas nas raízes da plantas, podendo ser utilizada para diversas finalidades, como por exemplo, associados a genes de tolerância à seca.

## REFERÊNCIAS

- BATTRAW, M. J.; HALL, T. C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- $\beta$ -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. **Plant Molecular Biology**, v. 15, n. 4, p. 527–538. 1990.
- BRANDALISE, M. **Isolamento e Caracterização de Promotores Tecido-Específicos de Raiz e Folha de *Coffea arabica***. 141 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu, São Paulo, 2007.
- CHEN, L. et al. The characterization of GmTIP, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 2015.
- FAKTOR, O. et al. Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals sequence motifs essential for floral expression. **Plant Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 849–859. 1996.
- FILICHKIN, S. A. et al. Alcohol-inducible gene expression in transgenic *Populus*. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 7, p. 660–667. 2006.
- GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 67, n. 1, p. 16–37. 2003.
- GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of *eucalyptus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, n. 1, p. 9–23. 2011.
- GRUNENVALDT, R. L. **Clonagem de Promotores Raiz-Específicos de *Eucalyptus grandis* E Validação em *Nicotiana tabacum***. 55 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Área de Concentração Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- HATTORI, T.; NAKAGAWA, S.; NAKAMURA, K. High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown in vitro on sucrose medium. **Plant Molecular Biology**, v. 14, n. 4, p. 595–604. 1990.
- HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119. 2014.
- LEE, S.; KORBAN, S. S. Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. **Planta**, v. 215, n. 4, p. 689–693. 2002.
- LI, X-G. et al. Impact of copy number on transgene expression in tobacco. **Acta Botanica Sinica**, v. 44, n. 1, p. 120-123. 2002.
- LI, X. et al. Influence of DNA methylation on transgene expression. **Chinese Science Bulletin**, v. 46, n. 15, p. 1300-1304. 2001.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 103–120. 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v.30, p.421-327. 1981.

MAEO, K. et al. Sugar-responsive elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. **Plant molecular biology**, v. 46, n. 5, p. 627–37. 2001.

MURASHIGE T, SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**. p. 473-479. 1962

NEALE, D. B.; KREMER, A. Forest tree genomics: growing resources and applications. **Nature Reviews - Genetics**, v. 12, n. 2, p. 111–122. 2011.

NITZ, I. et al. Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 161, n. 2, p. 337–346. 2001.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. **in Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, p. 1–22. 2004.

RAJEEVKUMAR, S.; ANUNANTHINI, P.; SATHISHKUMAR, R. Epigenetic silencing in transgenic plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 693. 2015.

ROMBAUTS, S. et al. Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. **Plant physiology**, v. 132, n. 3, p. 1162–76. 2003.

SCHNELL, J. et al. A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. **Transgenic Research**, v. 24, n. 1, p. 1–17. 2015.

SHAH, S. H. et al. Use of Different Promoters in Transgenic Plant Development : Current Challenges and Future Perspectives. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental**, v. 15, n. 4, p. 664–675. 2015.

VAUGHAN, S. P. et al. Characterization of FaRB7, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3901–3910. 2006.

WANG, X.; HABERER, G.; MAYER, K. F. X. Discovery of cis-elements between sorghum and rice using co-expression and evolutionary conservation. **BMC genomics**, v. 10. 2009.

XIAO, K. et al. Isolation and characterization of root-specific phosphate transporter promoters from *Medicago truncatula*. **Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 439–449. 2006.

YAMAMOTO, Y. T. et al. Characterization of cis-Acting Sequences Regulating Root-Specific Gene Expression in Tobacco. **The Plant Cell**, v. 3, p. 371–382. 1991.

ZHU, Z.; HUGHES, K. W.; HUANG, L. Effects of 5-azacytidine on transformation and gene expression in *Nicotiana tabacum*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 27, n. 2, p. 77–83. 1991.