



**JOSILENE FÉLIX DA ROCHA**

**PRÉ-VALIDAÇÃO DE PROMOTOR TECIDO-ESPECÍFICO  
DE RAIZ E GENES DE RESISTÊNCIA A FUSARIOSE EM  
*Nicotiana tabacum***

**LAVRAS - MG  
2018**

**JOSILENE FÉLIX DA ROCHA**

**PRÉ-VALIDAÇÃO DE PROMOTOR TECIDO-ESPECÍFICO DE RAIZ E GENES DE  
RESISTÊNCIA A FUSARIOSE EM *Nicotiana tabacum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de doutora.

Orientador  
Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

**LAVRAS - MG  
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rocha, Josilene Félix da.

Pré-validação de promotor tecido-específico de raiz e genes de  
resistência a fusariose em *Nicotiana tabacum* / Josilene Félix da  
Rocha. - 2018.

81 p. : il.

Orientador(a): Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Fusariose. 2. Musa spp. 3. Transformação genética. 4.  
Tabaco. I- Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JOSILENE FÉLIX DA ROCHA**

**PRÉ-VALIDAÇÃO DE PROMOTOR TECIDO-ESPECÍFICO DE RAIZ E GENES DE  
RESISTÊNCIA A FUSARIOSE EM *Nicotiana tabacum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de doutora.

APROVADA em 17 de agosto de 2018.

Dra. Ana da Silva Léo

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dra. Ana Veruska Cruz da Silva Muniz

Universidade Federal de Sergipe

Dra. Caroline de Araujo Machado

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Dra. Daniela Droppa Almeida

Universidade Tiradentes

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

*A toda família Félix, em especial, aos meus avós maternos  
Maurina Alves de Lima e Francisco Félix de Lima  
Meus exemplos de amor, compaixão e fé em Deus!*

*A toda família Rocha, em especial, aos meus avós paternos  
Maria Gomes da Rocha e Aurentino Gomes da Rocha  
Meus exemplos de amor, perseverança e superação!*

*Aos meus pais, Glacilene Félix de Lima Rocha e José Gomes da Rocha  
A minha irmã, Rosilene Félix da Rocha e meu sobrinho, Guilherme Félix Rocha Lopes  
Por serem a sustentação do meu sorriso e me ensinarem a humildade de ser quem sou e ser  
feliz.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a Deus, pois quando minha mente e meu corpo enfraqueciam, quando pensava que não ia suportar, que ia desistir... essa força, esse Deus e essa fé me fizeram levantar e recomeçar.

A toda minha família e, em especial, aos meus Pais, Glacilene Félix de Lima Rocha e José Gomes da Rocha, a minha irmã Rosilene Félix da Rocha e meu sobrinho Guilherme Félix Rocha Lopes, meus amores infinito, meu porto seguro! Agradeço por serem toda essa estrutura que me sustenta e por acreditarem em mim mais que eu mesma... Mesmo com a distância física, pensar em vocês foi o que sempre me deu forças para seguir em frente, acreditar em meus sonhos e batalhar para alcança-los.

Ao pesquisador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos da Embrapa Rondônia, que foi meu orientador na graduação e mestrado contribuindo ricamente para minha formação, sendo um grande incentivador disso tudo.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade concedida.

A Embrapa Tabuleiros Costeiros, pela infraestrutura para a realização dos trabalhos.

Ao meu orientador Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz pelos valiosos ensinamentos, disponibilidade e, principalmente, pela paciência que teve comigo. Sou muito grata!

Ao pesquisador Dr. Hugo Bruno Correa Molinari da Embrapa Agroenergia, por ceder as sementes *Nicotiana tabacum* cv. SRI e a AGRO EHA 105.

A pesquisadora Dra. Andréa Almeida Carneiro da Embrapa Milho e Sorgo, por ceder o vetor PTF102.

Aos pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Dra. Cláudia Fortes Ferreira, Dr. Edson Perito Amorim, Dr. Fernando Haddad e Dra. Janay Almeida dos Santos Serejo por cederem as sequências dos genes e as mudas de banana ‘BRS Platina’.

As pesquisadoras Dra. Ana Lédo e Dra. Ana Veruska pelos ensinamentos, sempre com palavras de motivação e apoio. Sou muito grata e sempre levarei vocês como inspiração para a pesquisa, para a ciência, para a vida!

Ao técnico do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, Inácio Roque de Andrade Junior. Grata pela disponibilidade em ajudar sempre que foi necessário, pela amizade, pelas boas conversas e risadas.

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular, Silvio Santos. Grata por todo apoio prestado, pela amizade, conversas, sempre me motivando e me fazendo acreditar que era possível.

Ao pessoal dos Laboratórios de Microbiologia de Solos (José Guedes, Robinson e Dona Vera), Fitossanidade (Francisco José e Ricardo) e Ecofisiologia Vegetal (Bruno, Robson e Fernando). Grata pela atenção e disponibilidade em ajudar sempre que foi necessário.

A equipe LabCult (Carol, Cida, Cyntia, Fernanda, Flávia, Leila, Lucas, Milena, Paulo, Rafael e Sara) e LabMol (Ariane, Dani, Eliana, Flaviana, Jéssica e Letícia), tanto quem esteve o tempo todo quanto quem esteve em algum momento no decorrer de minha estadia. Agradeço por cada contribuição, pessoas maravilhosas que me acolheram, me ajudaram, me apoiaram, me consolaram e mesmo diante de tudo sempre estiveram dispostos a bons papos, boas risadas e bons momentos juntos. Gratidão as gatas e gatos do meu coração!

Em especial, agradeço a Isabella, parceira inigualável, na Embrapa, nos experimentos, nas aventuras e na vida. Sempre disposta a ajudar, com uma tranquilidade sem igual, emitindo sempre aquela energia positiva com seu otimismo. Tá na lista das preciosidades que o doutorado me permitiu conhecer!

Agradecimento especial também para Annie Carolina Araújo de Oliveira e para sua família maravilhosa, acolhedora e divertida que me adotou nos dias em que a solidão mais apertou meu coração. Gratidão por ser essa lua que ilumina mesmo em suas diferentes fases! Obrigada pela companhia, pelas conversas sobre ciência e sobre a vida, pelas aventuras e risadas compartilhadas.

A Tatiana Santos Costa, pessoa muito especial e fundamental para a realização deste trabalho, devido aos seus valiosos ensinamentos da prática de laboratório. Gratidão pela paciência, por me socorrer sempre que precisei, pelos conselhos, pelas conversas e sorrisos.

As meninas da república de Lavras, que sempre que puderam estiveram presentes, apoiando, com boas conversas, adicionando momentos felizes e de descontração para amenizar a saudade de casa. Grata pela boa convivência Camila, Danuza, Letícia e Natália.

Agradeço aos amigos de Rondônia que mesmo na distância sempre se fizeram presentes. Marcela dos Santos Lima Façanha, minha melhor amiga, irmã de coração e

comadre, você e meu compadre Façanha são os anjos da minha vida, meu peito transborda de orgulho de ter vocês como amigos e mais ainda de gratidão pelo presente que me deram, Calú, a afilhada mais amor que alguém poderia ter, eu ganhei. Por vezes me peguei a pensar que exemplo eu seria para ela e isso me estimulou a seguir em frente. Gratidão!

A Ozelma Alves Marques, minha melhor parceria, sempre presente, mesmo na distância. Com sorrisos sempre dispostos e palavras de apoio e animação, os dias que pude estar com você e com Renato tornaram meu fardo mais leve. Grata por fazerem a diferença tornando meus dias mais felizes e minha mente mais leve. Gratidão!

A Wanessa Oliveira Nogueira, gêmula amada, nos desencontramos e nos reencontramos mesmo na distância, pois somos como borboletas que o vento tirou pra dançar, a metamorfose é parte, mas a essência prevalece. Gratidão!

A Michele Aparecida, amiga, parceira, não precisamos nos falar ou nos ver todos os dias, mas sempre que nos encontramos é como se nunca tivéssemos ficado distantes. Obrigada pelo apoio de sempre e por ser inspiração de força e determinação para mim.

A Renata Araújo Neves, amiga desde a adolescência, acompanhou toda minha trajetória mesmo distante, cada uma vencendo suas batalhas, sempre demos um jeito de conversar, sorrir e se ajudar. Gratidão!

A Crys Oliveira, minha amiga, comadre, exemplo de mãe e mulher batalhadora, sou grata por ter você e Luan em minha vida, pois são parte da motivação pra eu seguir em frente.

A Maria Irismar Silva de Souza e Dinal Ferreira Brasil por todo apoio prestado e disponibilidade em ajudar sempre que fosse preciso. Sou imensamente grata!

Por último, não menos importante, agradeço ao meu companheiro, melhor amigo, melhor amor, Dinal Ferreira Brasil Filho. Foram incontáveis as vezes que me amparou em seus braços quando não pude me levantar sozinha. No decorrer desses anos, foi quem acolheu meu choro e o transformou em risos, foi quem ignorou minha raiva e se muniu de paciência, foi quem me curou do estresse e da ansiedade rotineira me levando para as melhores aventuras. Seu otimismo e companheirismo fez da minha realidade a realização de um sonho, um sonho que foi sonhado junto desde quando quis voar comigo! Obrigada por voar comigo e me acompanhar em mais essa aventura!

Enfim, agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!



*“De um lado a poesia, o verbo, a saudade. Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim... E o fim é belo, incerto, depende de como você vê... O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só.” (Fernando Anitelli)*

## RESUMO

A produção de plantas geneticamente modificadas com características específicas é um processo altamente promissor para o melhoramento genético de plantas que têm sido severamente ameaçadas por doenças como a fusariose, por exemplo, que causa grandes perdas econômicas. Além da mineração de inúmeros genes candidatos que poderão ser usados para testes de resistência a estas doenças, a falta de promotores tecido-específico que permitam que estes genes sejam expressos apenas nos tecidos alvo aumentam ainda mais a desconfiança da população a cerca do uso de plantas geneticamente modificadas. Pesquisas sobre o uso de promotores tecido-específicos são importantes, uma vez que esses direcionam a expressão de genes apenas nos órgãos/tecidos de interesse, evitando a expressão em todas as partes da planta, que além de ter elevado custo energético, pode causar efeitos fenotípicos indesejáveis. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a efetividade de um promotor tecido-específico para raiz e a funcionalidade de dois genes candidatos (Foc1 e Foc2) de resistência a fusariose mediante transformação genética de uma planta modelo (*Nicotiana tabacum*) utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Nos resultados da análise da expressão do gene repórter *GUS* sob a regulação do promotor tecido-específico (Prom\_Musa\_Embrapa\_005) na versão parcial (pCore) foi possível confirmar sua direcionalidade para raiz, pois no ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) realizado em folha e raiz de *N. tabacum* transformado não houve detecção de atividade *GUS* na folha, tendo apresentado atividade apenas na raiz, especialmente, na coifa, demonstrando potencial para fornecer uma expressão focalizada. Na análise da expressão gênica por qPCR também foi possível verificar a expressão específica do gene *GUS* na raiz das plantas transformadas com o promotor e a expressão constitutiva do controle positivo assim como do gene de resistência candidato (Foc1). A expressão constitutiva de Foc1 ocorreu como esperado, pois o gene estava sob regulação do promotor CaMV-35S. A partir desta análise é possível confirmar que as plantas foram efetivamente transformadas com o gene de resistência. Foc1 apresenta potencial para ser introduzido em cultivares de interesse, auxiliando no desenvolvimento de variedades resistentes a fusariose. Este estudo subsidiará o preparo de novas construções com promotores tecido-específicos regulando a expressão do gene Foc1.

**Palavras-chave:** *Agrobacterium tumefaciens*. Fusariose. *Musa* spp. Tabaco. Transformação genética.

## ABSTRACT

The production of genetically modified plants with specific characteristics is a highly promising process for plant genetic breeding that have been severely threatened by diseases such as fusarium wilt, for example, which causes great economic losses. In addition to the data mining of numerous candidate genes that could be used for teste disease resistance, the lack of tissue-specific promoters that allow these genes to be expressed only in target tissues, increase the population's distrust of plant genetically modified. Research on the use of tissue-specific promoters is important, since they drive the genes expression only in the organ/tissue of interest, avoiding expression in all parts of the plant, which in addition to having a high energy cost, can cause undesirable phenotypic effects. The main of this work was to evaluate *in vitro* the effectiveness of a root tissue-specific promoter and the functionality of two resistance candidate genes (Foc1 and Foc2) against fusarium wilt through genetic transformation of a model plant (*Nicotiana tabacum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. In the results of the expression analysis of GUS reporter gene under the regulation of the tissue-specific promoter (Prom\_Musa\_Embrapa\_005) in a core version (pCore) it was possible to confirm their specificity to the root, once the histochemical assay to detect the enzymatic activity of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) made in leaf and root tissues of transformed *N. tabacum*, showed activity only in root, especially in the root cap, demonstrating the potential to provide a focused expression. In the gene expression analysis by qPCR it was also possible to verify the specific expression of the GUS gene in the roots of transformed plants with the promoter and the constitutive expression of the positive control as well as with the candidate resistance gene (Foc1). The constitutive expression of Foc1 occurred as expected because the gene was under CaMV-35S promoter regulation. From this analysis it is possible to confirm that the plants were effectively transformed with the resistance gene. Foc1 presents potential to be introduced into cultivars of interest, making possible the development of fusarium wilt resistant varieties. This study will support the preparation of new constructs with tissue-specific promoters regulating Foc1 gene expression.

**Key words:** *Agrobacterium tumefasciens*. Fusarium wilt. *Musa* spp. Tobacco. Genetic transformation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da PCR com o DNA do clone BAC_125A12 para obtenção da sequência promotora Prom_Musa_Embrapa_005 na versão completa (2kb) e parcial (340pb).....	45
Figura 2 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da PCR com o DNA da cultivar 'BRS Platina' para obtenção da sequência dos genes candidatos Foc1 (pCAMBIA1391z e PTF102) e Foc2 (pCAMBIA1391z e PTF102).....	46
Figura 3 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a digestão dos vetores com enzimas de restrição.....	47
Figura 4 -	Mapa linear do vetor pCAMBIA1391z com os promotores Prom_Musa_Embrapa_005 nas versões pFull (A) e pCore (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.....	47
Figura 5 -	Mapa linear do vetor pCAMBIA1391z com os genes Foc1 (A) e Foc2 (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.....	48
Figura 6 -	Mapa linear do vetor pTF102 com os genes Foc1 (A) e Foc2 (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.....	48
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>E. coli.</i> transformadas com os vetores pCambia1391z (C+pCAM) e com pTF102 (C+ pTF).....	49
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>E. coli.</i> transformadas com pCambia1391z + pFull.....	49
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>E. coli.</i> transformadas com pCambia1391z + pCore.....	50
Figura 10 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>E. coli.</i> transformadas com pCambia1391z + Foc1.....	51
Figura 11 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com o DNA plasmidial da <i>E. coli.</i> transformada com pTF102 + Foc1.....	51
Figura 12 -	Placas com meio LB e antibiótico de seleção canamicina (50 mg/L) 48 horas após o teste para a detecção do gene uidA (gene da $\beta$ -glucuronidase) em <i>Escherichia coli.</i> .....	52

Figura 13 -	Placas com meio LB e antibiótico de seleção espectinomicina (50 mg/L) 48 horas após o teste para a detecção do gene uidA (gene da $\beta$ -glucuronidase) em <i>Escherichia coli</i> .....	53
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformadas com o vetor pCambia1391z (controle positivo).....	54
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformadas com o vetor pTF102 (controle positivo - pTF).....	54
Figura 16 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformadas com pCambia1391z + pFull.....	55
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformadas com pCambia1391z + pCore.....	55
Figura 18 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformadas com pCambia1391z + FOC1.....	56
Figura 19 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com o DNA de duas amostras de <i>A. tumefaciens</i> EHA 105 transformada com pTF102 + Foc1.....	57
Figura 20 -	Etapas da cultura de tecidos envolvendo a transformação de <i>N. tabacum</i> com plasmídeos pCambia1391z recombinados.....	58
Figura 21 -	Etapas da cultura de tecidos envolvendo a transformação de <i>N. tabacum</i> com plasmídeos pTF102 recombinados.....	59
Figura 22 -	Imagens dos ensaios histoquímicos para detecção da atividade enzimática $\beta$ -glucuronidase (GUS) nas plantas transformadas de <i>N. tabacum</i> .....	61
Figura 23 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com o controle positivo (pCambia1391z) e com pCambia1391z + pCore, utilizando o par de primers GUSF/GUSR.....	62
Figura 24 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com pCambia1391z + pCore, utilizando o par de primers P28CO-Fw/ P28-Rv.....	63
Figura 25 -	Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a	

	PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com pCambia1391z + Foc1, utilizando o par de primers FOC1-FI/FOC1/RI.....	63
Figura 26 -	Expressão do gene GUS analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas e raízes de <i>N. tabacum</i> transformado com o vetor pCambia1391z.....	64
Figura 27 -	Expressão do gene GUS analisada por PCR quantitativa em tempo real nas raízes de <i>N. tabacum</i> transformado com a construção pCambia1391z + pCore.....	65
Figura 28 -	Expressão do gene Foc1 analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas e raízes de <i>N. tabacum</i> transformado com a construção pCambia1391z + Foc1.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reação para a digestão do vetor pTF102 com a enzima <i>SspI</i> .....	36
Tabela 2 -	Reação para a digestão do vetor pCAMBIA1391z com as enzimas <i>AvrII</i> e <i>BglIII</i> .....	36
Tabela 3 -	Reação para a digestão do vetor pCAMBIA1391z com as enzimas <i>AvrII</i> e <i>PmlI</i> .....	36
Tabela 4 -	Mix para a desfosforilação dos plasmídeos com a enzima CIAP ( <i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> ).....	37
Tabela 5 -	Mix para as reações de ligação entre pCAMBIA1391z e pFull (promotor completo) e entre pCAMBIA1391z e pCore (promotor parcial).....	37
Tabela 6 -	Mix para as reações de ligação entre pCAMBIA1391z e Foc1 e entre pCAMBIA1391z e Foc2.....	37
Tabela 7 -	Mix para as reações de ligação entre pTF102 e Foc1 e entre pTF102 e Foc2.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ANA	Ácido naftalenoacético
BAC	<i>Banana Genomics Consortium</i>
BAP	6-benzilaminopurina
CaMV 35S	Vírus do Mosaico da Couve Flor
CHIC	<i>Cysteine-rich hydrophobic</i>
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
cDNA	DNA complementar
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
Foc	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>
Fon	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>nicotianae</i>
g	<i>Relative Centrifugal Force</i> (RCF) or <i>G-force</i>
Gene AVR	Gene de avirulência
Gene R	Gene de resistência
GUS ( <i>uidA</i> )	Gene da $\beta$ -glucuronidase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani (1951)
LRR	<i>Leucine rich repeat</i>
M	Molar
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
NB	<i>Nucleotide binding domain</i>
NB-LRR	<i>Nucleotide binding-leucin rich repeat</i>
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pCore	<i>Core promoter</i> (parcial)



pFull	<i>Full promoter (completo)</i>
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RT4	Raça 4 Tropical
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>
SIX	<i>Sine oculis homeobox</i>
T-DNA	<i>Transferred DNA</i>
Ti	<i>Tumor inducing</i>
TIR	<i>Toll Interleukin-1 receptor</i>
TSS	<i>Transcription start site</i>
Ubi	Ubiquitina
VCG	<i>Vegetative Compatibility Groups</i>
X-GlcA	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl <math>\beta</math>-Dglucuronide</i>

## **LISTA DE SIGLAS**

LCTP	Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas
LBM	Laboratório de Biologia Molecular

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	Fusariose: agente causal <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (Foc).....	21
2.2	Hospedeiro e variação do patógeno.....	22
2.3	Resistência de Plantas a Patógenos.....	13
2.4	A espécie <i>Nicotiana tabacum</i> .....	25
2.5	Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	26
2.6	Uso de promotores tecido-específicos em transformação genética.....	27
2.7	Transformação genética utilizando genes de resistência.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Obtenção da sequência promotora Prom_Musa_Embrapa_005.....	33
4.2	Obtenção da sequência dos genes candidatos.....	34
4.3	Obtenção dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102.....	35
4.4	Transformação dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102 com seus respectivos insertos.....	38
4.5	Preparo de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 e transformação via choque térmico.....	39
4.6	Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> para validar promotor Prom_Musa_Embrapa_005 e genes (Foc1 e Foc2).....	40
4.6.1	Preparo da cultura de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> linhagem EHA105.....	40
4.6.2	Transformação de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. SRI.....	40
4.6.3	Regeneração das plantas transformadas.....	41
4.7	Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática $\beta$ -glucuronidase (GUS).....	41
4.8	Extração de DNA.....	42
4.9	Extração de RNA.....	43
4.10	Tratamento com DNase.....	43
4.11	Transcriptase reversa (RT).....	43
4.12	Testes dos Genes de Referência.....	44
4.13	Ensaio de qPCR.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Confirmação da obtenção da sequência promotora Prom_Musa_Embrapa_005.....	45
5.2	Confirmação da obtenção da sequência dos genes candidatos.....	46
5.3	Confirmação da digestão dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102.....	46
5.4	Confirmação da transformação dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102, com seus respectivos insertos em <i>E. coli</i> .....	48
5.5	Confirmação da transformação dos plasmídeos recombinantes em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	54
5.6	Transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	57
5.7	Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática $\beta$ -glucuronidase	

	(GUS) nas folhas e raízes das plantas transformadas.....	60
5.8	Análises moleculares das plantas transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	62
5.9	Ensaio de PCR em tempo real (qPCR).....	64
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICE.....	78
	ANEXOS.....	79

## 1 INTRODUÇÃO

A fusariose ou mal-do-Panamá, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) é considerada uma das cinco doenças mais importantes economicamente (PLOETZ, 2015). Essa doença levou à falência poderosas empresas e a redução da banana Maçã do mercado brasileiro, sendo considerada a doença mais destrutiva da espécie.

A murcha de fusarium como também é conhecida é o maior fator limitante na produção de banana em todo o mundo (BUTLER, 2013). Uma vez que o solo está infestado por Foc, as variedades que são sensíveis não podem ser replantadas por décadas (ROCHA et al., 2017). O fato da doença ser causada por um fungo do solo, que mesmo na ausência da cultura sobrevive por períodos prolongados, faz com que a medida de controle mais efetiva seja o uso de variedades resistentes. Todavia, o patógeno apresenta alta variabilidade, sendo o surgimento de novas raças uma preocupação constante (SILVA et al., 2016; MOSTERT et al., 2017).

No Brasil, a fusariose foi inicialmente observada em 1930, no município de Piracicaba, São Paulo e em cerca de 3 a 4 anos, dizimou aproximadamente um milhão de bananeiras do tipo ‘Maçã’. Posteriormente, grandes áreas da cultivar ‘Maçã’ foram dizimadas em outras regiões dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Espírito Santo, sendo que, neste último, mais de 20% das plantas pertencentes ao grupo ‘Prata’, também foram eliminadas. Assim, a produção de banana foi sendo reduzida em muitos países desde a América Central até a Ásia (PLOETZ, 2015; WEN et al., 2015).

Vários métodos de controle da doença têm sido avaliados, incluindo o melhoramento genético de plantas (SMITH et al., 2006; WANG et al., 2015). A modificação genética de por meio de estratégias adequadas é potencialmente a melhor abordagem para o desenvolvimento de bananeiras elite, resistentes à todas as raças de Foc (GHAG et al., 2014; LIU et al., 2017).

O programa de melhoramento genético da bananeira no Brasil tem sido conduzido desde 1983 pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, BA, dentre vários aspectos, para a obtenção de genótipos resistentes a fusariose. Algumas variedades foram lançadas; porém um esforço maior ainda se faz necessário. Os mecanismos de resistência e defesa da bananeira à Foc podem ser subsidiados usando outros modelos como hipótese. Novas informações provenientes do estudo da interação *Musa* spp. x Foc são de extrema importância, uma vez que na identificação de novos genes candidatos, esses poderão ser prontamente usados na transformação via cisgenia e com isso acelerar os programas de melhoramento de bananeira que visam o desenvolvimento de variedades resistentes à fusariose.

Com o emprego de técnicas, como a transformação genética, utilizando promotores tecido-específicos, que favorecem o manejo dos genes da própria espécie em questão, é possível produzir plantas resistentes a nematoides, fungos, bactérias e vírus, num período de tempo significativamente menor do que usando o melhoramento convencional.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi de avaliar a eficiência de um promotor tecido-específico para raiz e de dois genes candidatos de resistência de *Musa* spp. mediante transformação genética de *Nicotiana tabacum* por *Agrobacterium tumefaciens*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fusariose: agente causal *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

A fusariose é também conhecida como murcha de *Fusarium* ou Mal-do-Panamá. A doença surgiu na região indo-malaia, centro de origem do gênero *Musa*, afetando variedades susceptíveis, que mais tarde foram introduzidas no Novo Mundo, a partir da África. Os primeiros prejuízos importantes foram relatados no Panamá, em 1904. Relatos mostraram que em um período de 50 anos, mais de 40.000 ha de terras cultivadas com banana foram abandonadas devido à fusariose na América Central e do Sul (CORDEIRO; MATOS, 2003). Por esta razão, é considerada a doença mais devastadora que afeta plantações comerciais.

No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em 1930, em plantas de banana Maça no município de Piracicaba, SP. Em apenas três a quatro anos foram dizimados cerca de um milhão de bananeiras dessa região (CORDEIRO et al., 2005), posteriormente, a doença se disseminou por todo o território nacional.

O patógeno é um fungo de solo, onde apresenta alta capacidade de sobrevivência na ausência do hospedeiro, fato que, provavelmente, deve-se à formação de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (CORDEIRO; MATOS, 2003).

A classificação da espécie *Fusarium oxysporum* foi dividida em seções: *formae speciales* e raças. O conceito *formae speciales* foi aplicado para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprofíticos de mesma espécie, mas que diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos (SNYDER E HANSEN, 1953). Isolados patogênicos de *F. oxysporum* estão classificados dentro de mais de 120 *formae speciales* e raças. Assim, cada *forma specialis* possui um elevado grau de especificidade ao hospedeiro (NELSON et al., 1983).

Na cultura da banana o agente etiológico é o *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). A dispersão de Foc pode ocorrer a partir de rizomas, raízes e pseudocaule de plantas doentes. Além disso, animais, o homem, equipamentos e ferramentas podem ser agentes de disseminação (VENTURA E HINZ, 2002; GUO et al., 2014). O fungo Foc produz três tipos de esporos assexuados incluindo macroconídios, microconídios e clamidoconídios no seu ciclo de vida, o que lhe permite dispersar e sobreviver (GUO et al., 2014).

A infecção das plantas se inicia por meio do sistema radicular, principalmente pelas raízes secundárias, alcançando o xilema, onde ocorre abundante esporulação. Inicialmente, conídios de Foc germinam e formam hifas fúngicas no ambiente da planta hospedeira; as hifas se espalham para colonizar a superfície radicular; posteriormente, atravessam a epiderme e, em seguida,

invadem os vasos do xilema (GUO et al., 2014). Uma vez que o micélio do fungo entra nas raízes através de lesões naturais, a massa fúngica vai se multiplicando rapidamente e obstrui os vasos do xilema que conduz a oferta insuficiente de nutrientes e água para a planta, causando amarelecimento das folhas e, eventualmente, a murcha da planta inteira (LI et al., 2013). Plantas infectadas exibem um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo no sentido da nervura principal. Posteriormente, as folhas murcham, secam e se quebram junto ao pseudocaule (CORDEIRO; MATOS, 2003; CORDEIRO et al., 2005). Além disso, hifas e esporos contidos na planta podem cair no solo por meio da água da chuva e reiniciar um novo ciclo de infecção (GUO et al., 2014).

Dependendo do nível de resistência da cultivar, plantas doentes não chegam a produzir cachos, ou aquelas que produzem, têm frutos com valor comercial reduzido. Os fungos possuem paredes espessas e resistentes a flutuações ambientais, permitindo ao agente patogênico sobreviver no solo um longo período de tempo sem plantas hospedeiras (MOMMA et al., 2010). A medida de controle mais eficiente é o uso de variedades resistentes, mas sua utilização está condicionada às raças do patógeno (GROENEWALD et al., 2006; SMITH et al., 2006; PLOETZ, 2015; ROCHA et al., 2017).

## **2.2 Hospedeiro e variação do patógeno**

O patógeno *F. oxysporum* afeta uma grande variedade de hospedeiros em qualquer estágio de desenvolvimento. Tomate, tabaco, legumes, cucurbitáceas, batata doce e banana são algumas das plantas mais suscetíveis. Foc possui um alto potencial evolutivo, uma vez que já foram relatados 21 grupos de compatibilidade vegetativa (VCG – Vegetative Compatibility Groups) e quatro raças fisiológicas (PLOETZ, 2015).

Pelo sistema atual de classificação, a estrutura de raças de Foc em bananeira segue os seguintes critérios: raça 1 afeta ‘Gross Michel’ e ‘Maçã’, raça 2 a ‘Bluggoe’ e outras bananas de cocção, raça 3 não afeta genótipos de bananeira mas espécies de *Heliconia* spp. são altamente suscetíveis e a raça 4 as variedades do subgrupo Cavendish. A raça 4 foi subdividida em subtropical e tropical para diferenciar populações que afetam Cavendish em condições subtropicais ou tropicais (PLOETZ, 2015). A raça 4 Tropical (RT4), foi descrita no início da década de 1990 no Sul da Ásia, onde tem se disseminado rapidamente, causando severos danos e inviabilizando o plantio de banana nos locais afetados. Entre as raças conhecidas de Foc, as raças 1 e 4 são uma grande preocupação a nível internacional para a indústria da banana (GHAG et al., 2014).



Independentemente da ameaça que representa RT4, a fusariose é de extrema importância para o Brasil, pois as variedades mais consumidas no país (subgrupo Prata) apresentam suscetibilidade à doença; fato que também está relacionado com condições edafoclimáticas adversas. Atualmente, a doença é encontrada em praticamente todas as áreas em que é cultivado de banana (PLOETZ, 2015).

A Fusariose, causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *nicotianae* (Fon) é uma das doenças mais importantes e persistentes de tabaco (*N. tabacum*) (LAMONDIA, 2001). Ela provoca amarelecimento da folhagem que precede murcha. No entanto, às vezes uma murcha súbita ocorre sem qualquer coloração amarelada da folhagem (NTUI et al., 2011).

Estudos envolvendo transformação genética de tabaco estão sendo realizados para avaliar a interação patógeno-hospedeiro e verificar mecanismos de resistência. Uma linhagem transgênica de tabaco, sem marcador contendo um gene de quitinase (ChiC), isolado a partir da estirpe *Streptomyces griseus* HUT 6037 e outra contendo o gene wasabi (WD), isolado de *Wasabia japonica* foi produzida por transformação mediada por *Agrobacterium* para o aumento da resistência a fusariose (NTUI et al., 2011). Han et al. (2016), visando o melhoramento de *Lilium*, verificaram que o gene de glutationa S-transferase de *Lilium regale* Wilson, uma espécie de lírio selvagem, conferia resistência ao tabaco transgênico para *F. oxysporum* Qing.

Dessa forma é possível afirmar que a transformação genética de *N. tabacum* pode contribuir para estudos dos mecanismos de interação e resistência entre patógeno e hospedeiro. *N. tabacum* é uma espécie muito utilizada como modelo em transformação genética de plantas, devido à facilidade de transformação e avaliação da expressão dos genes inseridos (SANTOS et al, 2011).

### 2.3 Resistência de Plantas a Patógenos

Os patógenos de plantas são os principais fatores limitantes na produção agrícola, acarretando o uso extensivo de produtos químicos para controle. A resistência genética de plantas é uma alternativa promissora para controlar doenças e pragas de culturas (PILET-NAYEL et al., 2017). A resistência pode se manifestar de diferentes modos quanto à estabilidade e à especificidade, sendo regida geneticamente também de modo diferenciado. Conforme suas características pode ser classificada como resistência vertical (qualitativa) ou horizontal (quantitativa).

Embora exista exceções, a resistência qualitativa (vertical ou "major gene") é geralmente monogênica e completa, isto é, confere imunidade total (BROWN, 2015),

apresenta resistência a raças específicas e normalmente revela pouca estabilidade (VAN DER PLANK, 1982). E a resistência quantitativa (horizontal) é principalmente poligênica e parcial, isto é, a infecção ainda é possível, mas o desenvolvimento do patógeno é reduzido em maior ou menor extensão (RIMBAUD et al., 2018). Dessa forma, a resistência quantitativa é frequentemente descrita com eficácia em um ou mais componentes da agressividade do patógeno: menor taxa de infecção, maior período latente, menor produção de propágulos, menor período infeccioso ou menor produção de toxinas (MUNDT, 2014).

Os genes que conferem resistência raça-específica (genes R) atuam diferenciadamente com o genótipo do patógeno (raça fisiológica) e de acordo com a teoria gene a gene. Segundo Flor (1955), para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência. A evolução das interações gene-a-gene tem como consequência uma diversidade de genes R em diferentes indivíduos de uma espécie hospedeira e uma correspondente diversidade de genes de avirulência em diferentes raças do patógeno (STASKAWICZ et al., 1995).

Flor (1971) definiu pela primeira vez a resistência do tipo gene-a-gene em doenças de plantas, postulando que para a planta ser resistente a uma raça particular do patógeno, devem estar associados pares de genes de resistência (R) e de avirulência (Avr), no hospedeiro e no patógeno, respectivamente. Isso levou à predição de que, direta ou indiretamente, os genes R precisam codificar receptores para os produtos dos genes Avr específicos. Dessa forma, os produtos dos genes de avirulência do patógeno são reconhecidos direta ou indiretamente pelos genes R, os quais possuem domínios NB-LRR (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*) (JONES; DANGL, 2006; BOLLER; FELIX, 2009). Essa resistência é muito eficaz no bloqueio de doenças em muitas espécies, entretanto, esse tipo de resistência pode ser rapidamente superada pelo surgimento de novas raças do patógeno (QUIRINO; BENT, 2003).

As proteínas codificadas pelos genes R, provavelmente, operam utilizando uma gama limitada de mecanismos bioquímicos e desempenham duas funções básicas: reconhecer produtos de genes Avr dependentes de ligação e ativar a sinalização para uma rápida indução das várias respostas de defesa na planta (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Os genes R conferem resistência a diversos tipos de patógenos, incluindo viroses, bactérias, fungos, nematoides e insetos, e codificam proteínas similares com domínios NB-LRR. As proteínas NB-LRR possuem dois domínios: C e N-terminal que reconhecem o patógeno e ativam um padrão de transdução de sinal importante na resposta de resistência, respectivamente. Esta classe de genes foi dividida em duas subclasses distintas, baseando-se

na presença ou ausência do domínio N-terminal TIR (*Toll Interleukin-1 Receptor*) (PERAZA-ECHEVERRIA et al., 2008). Em dicotiledôneas são encontradas proteínas com o domínio N-terminal TIR e non-TIR, enquanto que, em monocotiledôneas são encontradas proteínas que codificam non-TIR-NBS-LRR na região N-terminal do Gene R.

O estudo da diversidade de genes R, bem como a organização genômica destes genes, tem despertado o interesse de diferentes pesquisadores, pois abrem novas perspectivas para o entendimento da evolução dos genes R e para o desenvolvimento de estratégias eficientes para o melhoramento visando resistência a doenças (FALEIRO et al., 2003).

Em estudos de diversidade de genes efetores no patógeno da banana *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, Czislowski et al. (2017) revelaram evidências de transferência horizontal de genes. Neste estudo utilizaram o sequenciamento do genoma de isolados de Foc para identificação inicial de homólogos para SIX1 a SIX14. As análises de PCR subsequentes confirmaram a distribuição e a diversidade dos genes SIX que foram estabelecidos pelo conjunto de dados do genoma inteiro. A análise da árvore de genes revelou que os genes SIX em Foc tinham uma história evolutiva que era incompatível com a filogenia de Foc estabelecida por meio de genes nucleares convencionalmente utilizados para a reconstrução filogenética. Sendo assim, eles defenderam a hipótese de que essa incompatibilidade refletia a transferência horizontal histórica de genes SIX entre linhagens geneticamente distintas de Foc. Embora as funções específicas das proteínas SIX sejam desconhecidas, algumas evidências indicam que elas promovem a virulência por meio da manipulação das vias hormonais e das respostas de defesa do hospedeiro (THATCHER et al., 2012; MA et al., 2013; GAWEHNS et al., 2014; MA et al., 2015).

#### **2.4 A espécie *Nicotiana tabacum***

*Nicotiana tabacum* L., popularmente conhecida como tabaco, é uma das espécies da família Solanaceae A. L. Jussie, com aproximadamente 106 gêneros e cerca de 3.000 espécies. É uma planta arbustiva, anual com ciclo de 120 a 240 dias de vida, e pode atingir até 2 metros de altura. Suas folhas apresentam formato elíptico, ou seja, com o comprimento maior que a largura. O caule é ereto, de secção circular, piloso e viscoso ao tato. Com raízes, em sua maioria, finas. As sementes são pequenas e numerosas (AKEHURST, 1981).

Os primeiros estudos de transformação genética de plantas envolveram a inoculação de tecidos de *N. tabacum* com linhagens engenheiradas de *Agrobacterium* (HERRERA-ESTRELLA et al., 1983; ZAMBRYSKI et al., 1983). Desde então, o tabaco tornou-se uma planta modelo muito importante para o estudo de processos biológicos extremamente

fundamentais (GAO et al., 2015). A espécie é muito utilizada em trabalhos envolvendo transformação genética, devido ao seu ciclo de vida curto, à facilidade de seu cultivo (*ex vitro* e *in vitro*) e de transformação e regeneração das plantas transgênicas. Além disso, é importante em pesquisas genéticas envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, cultura de tecidos, mutação induzida, silenciamento de genes por interferência de RNA (CRISPR/CAS9), protocolos de transformação e obtenção de transformantes (BRASILEIRO, 1998; MERCX et al., 2016; AQUINO et al., 2017).

## 2.5 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria tipicamente do solo, do tipo bacilo aeróbico e Gram-negativa. Na natureza ela causa crescimentos celulares neoplásicos em tecidos vegetais, isso resulta da transferência de um fragmento específico de DNA (chamado de DNA de transferência ou T-DNA) do plasmídeo bacteriano indutor de tumor (Ti) à célula hospedeira, seguida pela sua integração no genoma da célula vegetal e pela expressão dos genes introduzidos na mesma (TZFIRA; CITOVSKY, 2002).

O sistema de transformação via *Agrobacterium* é uma metodologia utilizada em diversas espécies vegetais. A eficiência da transformação, o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação e de seleção são as principais razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium* (BRASILEIRO; LACORTE, 2000; GAO et al., 2015; RUSTAGI et al., 2015; MERCX et al., 2016; AQUINO et al., 2017).

O processo de transformação genética vegetal mediada por agrobactérias pode ser considerado em sete etapas distintas: (1) o reconhecimento entre as células de *Agrobacterium* e as células vegetais, (2) a formação da fita-T e (3) seu empacotamento, (4) seu transporte intercelular, (5) sua introdução no núcleo da célula hospedeira, (6) a integração e (7) expressão dos genes integrados (TZFIRA; CITOVSKY, 2002).

Para a aplicação de agrobactérias na transformação de plantas, no entanto, faz-se necessário tornar estas bactérias incapazes de produzir os sintomas patológicos. A preparação de uma linhagem de *Agrobacterium* para ser utilizada como vetor na transformação de plantas inclui três etapas distintas: (1) obtenção de linhagens desarmadas por meio de um processo de dupla recombinação; (2) construção do vetor contendo no seu T-DNA os genes de interesse; e (3) o vetor binário deverá ser transferido para a linhagem desarmada de *Agrobacterium*, o que pode ser feito por métodos de conjugação triparental, eletroporação ou choque térmico (BRASILEIRO; LACORTE, 2000).

## 2.6 Uso de promotores tecido-específicos em transformação genética

O promotor é uma região reguladora do DNA localizada *upstream* da sequência codante do gene, sendo constituído por sequências de nucleotídeos que funcionam como ponto de reconhecimento para a ligação da RNA polimerase, conferindo assim, um ponto de controle para a transcrição regulada do gene. Em eucariotos, o início da transcrição depende da ligação ao promotor de um conjunto de proteínas designadas fatores de transcrição. Estes fatores se ligam às sequências promotoras, recrutando a RNA polimerase, a enzima que sintetiza o RNA a partir da região codante do gene. Os fatores de transcrição, por sua vez, são ativados sob as mais diversas situações, tais como estímulos endógenos (auxinas, giberelinas, ácido salicílico, ácido jasmônico) e exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura). A ação combinatória do promotor e dos fatores de transcrição determina a ativação ou repressão da expressão gênica (STEPHEN; JAMES, 2003; ANGELIN-BONNET et al., 2018).

O sítio de ligação dos fatores gerais de transcrição pode ser dividido em 3 partes: Promotor proximal, que é a sequência proximal *upstream* ao gene que tende a conter os elementos regulatórios primários. Esta região de 200-300 pares de base está upstream do promotor núcleo e contém sítios múltiplos de ligação dos fatores de transcrição, os quais são responsáveis pela regulação da transcrição específica. O promotor distal, que é a sequência distal *upstream* ao gene que pode conter os elementos regulatórios adicionais, geralmente com uma influência mais fraca do que a do promotor proximal. A posição não está muito clara, sabe-se apenas que está upstream (mas não como um enhancer (potencializador) ou outra região reguladora cuja influência é independente da posição/orientação). O promotor distal também possui sítios de ligação para os fatores de transcrição específicos (SMALE, 2001). E por fim, o promotor núcleo. O promotor núcleo é a região mínima do promotor que direciona o início preciso da transcrição. Ela contém o sítio de início da transcrição (TSS) e extensões típicas que vão de -60 a +40 relativos aos TSS (SMALE, 2003; DANINO et al., 2015). Os sinais que dirigem o início da transcrição convergem no promotor núcleo, que é a porta de entrada para a transcrição. A atividade do promotor núcleo depende largamente da presença ou ausência de sequências de DNA específicas conhecidas como elementos do promotor núcleo ou “motifs” (VO NGOC et al., 2017). Segundo Roy e Singer (2015), o promotor núcleo funciona como uma plataforma sobre a qual a maquinaria de transcrição monta. Entre os fatores recrutados para promotores nucleares encontram-se a enzima RNA Pol II, que transcreve os codificadores de proteína e muitos RNAs não codificadores e os múltiplos GTF e cofatores necessários para a síntese e biogênese de RNA. Estima-se que este

complexo transcricional é bem mais de um megadalton em tamanho e pode ocupar mais de cem pares de bases de DNA em torno do local de início da transcrição (TSS).

Os promotores constituem uma ferramenta chave em processos biotecnológicos a fim de garantir que a expressão de um gene de interesse seja efetiva e regulada. A disponibilidade de promotores que diferem na sua capacidade de regular os padrões de expressão temporal e espacial do transgene tende a aumentar a aplicação bem-sucedida de tecnologia transgênica. Ao longo dos anos, numerosos promotores foram isolados a partir de uma grande variedade de organismos e aplicados em sistemas de engenharia genética das plantas (POTENZA et al., 2004).

Os promotores podem ser classificados, como constitutivo, induzível e específico de órgãos ou de tecidos. Um promotor constitutivo direciona a expressão de um gene em todos os tecidos de uma planta durante os vários estádios de desenvolvimento. Um promotor específico de tecido direciona a expressão do gene apenas em certos tecidos, e pode ou não ser ativado durante todas as fases de desenvolvimento. Um promotor induzível inicia a expressão gênica em resposta a agentes químicos, físicos ou estresses bióticos e abióticos. Estudos referentes à caracterização e identificação dos promotores permitem explorar o potencial genético e a manipulação genética de diversas espécies de interesse agrônômico e florestal (GRUNENVALDT et al., 2015).

Dentre os promotores comumente utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas, destacam-se o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes que codificam a nopalina sintetase (NOS) e a octopina sintetase (OCS), ambos de *A. tumefaciens*, e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (Ubi-1) de milho. De forma particular, o promotor CaMV 35S é valioso porque proporciona uma expressão elevada em todas as regiões da planta transformada e geralmente encontra-se disponível no cassete do vetor utilizado para transformação, o que facilita a subclonagem do transgene de interesse (POTENZA et al., 2004). Promotores constitutivos como o CaMV 35S, quando associados, por exemplo, a genes de seleção de transformantes (tais como os que conferem resistência a antibióticos) determinam, em geral, a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta, e isso nem sempre é desejável e causa preocupação a respeito dos efeitos dos transgênicos no meio ambiente (GRUNENVALDT et al., 2015).

A utilização de promotores específicos que induzem e controlam especificamente a expressão do gene em órgãos e/ou tecido pode ser vantajosa para evitar uma perda de energia e de nutrientes, quando a proteína de interesse não é necessária em toda a planta. Além disso, a utilização destes promotores é conveniente em ambos os contextos comerciais e científicos,

pois proporciona maior segurança biológica, entre outras vantagens, o isolamento e a caracterização de promotores específicos apropriados para a engenharia genética de plantas (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011).

A expressão do gene marcador da  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) dirigido pelo promotor rol A (pBRA3) em plantas transgênicas de batata (cvs. Macaca e Baronesa) foi observada por Torres et al. (2003). A expressão transiente e estável foi tecido-específica localizada, sobretudo, no sistema vascular de entrenós e ausente em raízes e folhas. As plantas *GUS* positivas foram avaliadas por PCR, utilizando primers (iniciadores) específicos para o gene *npt II*. E nenhuma alteração fenotípica foi observada em plantas transgênicas, em relação às não transformadas. A expressão floema-específica de genes em batata terá um amplo potencial de utilização com genes de resistência a doenças que afetam exclusivamente o tecido vascular.

A seleção do promotor utilizado na construção de transgene depende fundamentalmente dos objetivos almejados após a transformação genética (POTENZA et al., 2004). Promotores específicos podem conduzir a expressão de genes que conferem resistência a patógenos de maneira dirigida. No caso de toxinas para pragas, é possível limitar sua expressão somente ao órgão alvo desses organismos, impedindo a presença das toxinas no produto que será consumido pela população e também em outros órgãos que são utilizados na alimentação de animais, diminuindo, então, a probabilidade de que organismos não alvos sejam afetados (POTENZA et al., 2004). Na produção de biofármacos, o uso de promotores órgão-específicos é importante para expressar o gene naqueles órgãos que são capazes de produzir a proteína de forma apropriada (GRUNENVALDT et al., 2015).

Existem promotores de diferentes origens (viral, bacteriana e vegetal) capazes de direcionar a expressão específica em órgãos de plantas; no entanto, é desejável que estes promotores sejam originários da mesma espécie de plantas ou espécies filogeneticamente relacionadas, pois os sistemas de regulação são únicos e podem não funcionar da maneira prevista em espécies heterólogas distantes (TYAGI, 2001).

Promotores específicos de raiz são de particular interesse pela ampla variedade de aplicações. As proteínas recombinantes podem ser expressas para quase tudo que está relacionado com a interface raiz-solo usando a engenharia genética para a biorremediação de contaminantes do solo, proteção contra a seca, aumento da tolerância ao sal, captura de macro e micronutrientes e aumento da resistência a patógenos radiculares (POTENZA et al., 2004). Onyango et al. (2016) realizaram a clonagem de um promotor raiz-específico de milho (ZmRCP-1) e avaliaram sua expressão em plantas de bananeira transformadas via *A. tumefaciens*. O estudo revela que o

promotor ZmRCP-1 dirige a expressão do gene repórter *GUS* na coifa da raiz da banana transgênica, demonstrando potencial para fornecer uma expressão localizada contribuindo para a biossegurança de bananeiras resistentes.

Em estudos de avaliação dos padrões de expressão e intensidade de genes marcadores em arroz transformado (*Oryza sativa* L.), Liu et al. (2018) identificaram e caracterizaram funcionalmente três promotores tecido-específicos relacionados com a fotossíntese, correspondendo ao complexo de coleta de luz II, gene de ligação clorofila a/b (PvLhcb), fosfoenolpiruvato carboxilase (PvPEPC), e a subunidade II 10 kDa R do fotossistema (PvPsbR).

## 2.7 Transformação genética utilizando genes de resistência

Técnicas modernas de biotecnologia, como a cultura de tecidos de plantas, a manipulação genética e a biologia molecular, estão sendo aplicadas no melhoramento genético de plantas, permitindo o desenvolvimento de novas variedades.

O desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças pode ser considerado o método eficaz de controle de doenças de plantas. Diversas estratégias estão relacionadas com a introdução de genes que interferem no estabelecimento da doença como a utilização de genes que codificam proteínas relacionadas a patogênese (PR), genes que estimulam a defesa em plantas, genes maiores de resistência (R), genes que codificam para proteínas ou peptídeos antimicrobianos, genes relacionados a resistência derivada do patógeno (MOURÃO FILHO et al., 2010).

Com as ferramentas biotecnológicas atuais, incorporadas aos programas de melhoramento, genes específicos que podem interferir no estabelecimento da doença vêm sendo selecionados, e então, transferidos para variedades comerciais que já possuem características agrônomicas desejáveis, superando as barreiras de incompatibilidade sexual entre espécies. Os procedimentos utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes a doenças visam a introdução de genes que possam interferir no estabelecimento do patógeno no hospedeiro e conseqüentemente no desenvolvimento da doença (PR-proteínas, quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases), de genes de origem não vegetal que codificam proteínas antibacterianas (atacina, cecropina, lactoferrina), de genes que codificam proteínas relacionadas à patogenicidade e/ou estimulam o sistema de defesa das plantas (genes hrpN, PAP, bO), o uso de genes maiores (R) de resistência e o uso da resistência derivada do patógeno, com a introdução de genes da capa protéica de vírus e seqüências conservadas antisense do genoma de vírus (SCHINOR et al., 2006).

Os genes estudados em transformação genética podem ter diversas origens, como por exemplo, bactérias, fungos, vírus, outras plantas, animais ou até serem completamente sintéticos



(SHELTON et al., 2002). Novos estudos têm buscado usar genes da própria família ou espécie a ser geneticamente modificada, processo chamado de intragenia ou cisgenia. Os dois conceitos se baseiam na inserção de genes encontrados em plantas que sejam sexualmente compatíveis. Além disso, o uso de marcadores ou genes de seleção não é permitido. A cisgenia é a inserção de um gene completo incluindo suas regiões reguladoras; na intragenia é possível usar regiões reguladoras de outros genes, desde que estas também estejam presentes em organismos sexualmente compatíveis (ESPINOZA et al., 2013; HOLME et al., 2013).

Métodos de engenharia genética baseados na introdução de transgenes e no desenvolvimento de frutíferas transgênicas apresentam potencial para a obtenção de mudas de boa qualidade e com propriedades desejáveis e imprescindíveis para o sucesso da produção. Características como tolerância a estresses ambientais e resistência a doenças são objetivos interessantes, também buscados no melhoramento genético tradicional (RAI; SHEKHAWAT, 2014). Foram identificados genes de defesa *up regulated* (Proteínas PRs) na cultivar de banana ‘BRS PLATINA’, que podem estar envolvidos com a resistência a fusariose. Essas proteínas correspondem a genes citoplasmáticos de resistência, com domínios NB-LRR e de membrana, receptor like-kinase (COSTA, 2013).

Proteínas quinases exercem um importante papel na sinalização durante o reconhecimento e subsequente ativação/regulação dos mecanismos de defesa da planta (DING et al., 2008). A cultivar resistente apresenta um padrão de expressão altamente induzido para os receptores ricos em leucina presente na membrana plasmática. Os receptores quinase ricos em repetições de leucina estão envolvidos em várias funções biológicas incluindo percepção hormonal, crescimento, desenvolvimento e interação planta-patógeno (HAFFANI et al., 2004). Para Ding et al. (2015) as quinases estão associadas com o regulamento das características fisiológicas e virulência em *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Kumari et al. (2017) transformaram geneticamente a variedade de arroz japonesa TP309 utilizando dois genes de resistência para aumentar o espectro de resistência contra diferentes isolados de *M. oryzae*. Este estudo também demonstrou a eficácia da estratégia para o empilhamento de genes usando a abordagem de co-transformação para projetar resistência duradoura. A linhagem transgênica empilhada por dois genes desenvolvida neste estudo pode ser usada para entender os aspectos moleculares de vias relacionadas à defesa vis-a-vis de um único gene R contendo linhas transgênicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a efetividade de um promotor tecido-específico para raiz e a funcionalidade de dois genes candidatos de resistência de *Musa* spp. mediante transformação genética de *Nicotiana tabacum* utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Isolar e clonar a região promotora de expressão gênica, de caráter tecido-específico para raiz, em duas versões diferentes, *full-promoter* (completo) e *core promoter* (parcial);
- 2) Isolar e clonar dois genes candidatos potencialmente envolvidos na resistência a fusariose;
- 3) Analisar a expressão do gene repórter *GUS* sob a regulação do promotor tecido-específico;
- 4) Analisar a expressão gênica das plantas transformadas, por PCR convencional e quantitativa em tempo real - qPCR.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas (LCTP) e no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), ambos situados na Embrapa Tabuleiros Costeiros de Aracaju – SE.

### 4.1 Obtenção da sequência promotora Prom\_Musa\_Embrapa\_005

O clone de BAC contendo a sequência promotora (Prom\_Musa\_Embrapa\_005) foi obtido do ‘Banana Genomics Consortium’, os quais estavam armazenados a -80 °C, em tubos contendo LB+ cloranfenicol (12,5 µg/mL).

Para obtenção do DNA, uma alíquota do clone (BAC\_125A12) do estoque foi inoculada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) líquido contendo cloranfenicol (12,5 µg/mL) e incubada a 37 °C overnight sob agitação (4-7 g). O volume da cultura foi centrifugado a 2.000 g a 4 °C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspensionado em 200 µL de tampão GTE gelado (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH8.0 e 0,1 mg/mL RNase). A suspensão da etapa anterior foi transferida para microtubos e adicionados 400 µL de uma solução de NaOH (0,2 N) + 1% SDS. Após inversão dos tubos, os mesmos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos; Em seguida, foi adicionado 300 µL de uma solução de acetato de potássio (60 mL de acetato de potássio (5 M), 28,5 mL de ácido acético glacial e 11,5 mL de água - pH final entre 4,8-5,2) com inversão cautelosa dos tubos; Após centrifugação da mistura por 15 minutos a 18.928 g, 750 µL do sobrenadante foi transferido para novo microtubo; Cerca de 0,6 volume de isopropanol gelado (450 µL) foi adicionado e centrifugado a 18.928 g por 15 minutos para obtenção do pellet; Depois de remover o sobrenadante, o pellet foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e deixado secar em temperatura ambiente até tornar-se transparente; Por fim foi adicionado 40 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + (RNase 1,0 µL/ amostra) e após alguns minutos o DNA foi quantificado em Espectrofotometro UV-Vis, NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™).

A partir do DNA do clone BAC\_125A12 a sequência relativa às regiões completa e parcial do promotor foram obtidas via amplificação (PCR) das mesmas utilizando-se primers específicos (Apêndice A) com os sítios de digestão das enzimas *Avr* II (início) e *Bgl* II (fim), que foram utilizadas para a clonagem no vetor pCAMBIA1391z. Para a PCR foi utilizada a enzima Platinum® *Taq* polimerase (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador termociclador (Applied Biosystems/ProFlex™ 96-well) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguidos

de 35 ciclos de amplificação compostos das 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, temperatura média do par de primers por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Seguido por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Após a amplificação, o produto de PCR foi colocado em gel de agarose 1,5% e tampão TBE 1X, para a verificação do tamanho do fragmento obtido as bandas foram observadas no transluminador e fotodocumentador (L. Pix - Loccus Biotecnologia®). Depois da confirmação, o produto de PCR dos dois promotores amplificados foi purificado com o kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare®, EUA) segundo recomendações do fabricante.

#### **4.2 Obtenção da sequência dos genes candidatos**

A sequência dos genes candidatos foi obtida a partir do DNA de 'BRS Platina' por meio de PCR específica. Em trabalhos anteriores realizados na Embrapa Mandioca e Fruticultura, foram identificados genes para resistência expressos na cultivar 'BRS Platina', que também foram observados em estudos da interação *Musa* spp. x Foc (COSTA, 2013).

O protocolo utilizado para extração do DNA da cultivar 'BRS Platina' foi o de Doyle e Doyle (1987), com modificações. Foram coletadas amostras de folhas jovens e saudáveis; O tecido vegetal foi macerado e em seguida transferido para microtubos de 2 mL e adicionado 1 mL de solução tampão de extração. Em seguida, homogeneizado em vortex durante 5 segundos e incubados em banho Maria a 65° C por 45 a 60 min sendo homogeneizados a cada 10 min; Após serem retirados do banho Maria foram esfriados em temperatura ambiente; Posteriormente, adicionou-se 800 µL de clorofórmio: álcool Isoamílico (24:1), homogeneizando rapidamente; Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 11.200 g; Foi coletado, aproximadamente, 800 µL do sobrenadante e transferido para novos tubos de 1,5 mL devidamente identificados; Em seguida foi adicionado 600 µL de álcool Isopropílico (gelado). Após homogeneização amena, os tubos foram incubados a -20 °C por 60 minutos; Em seguida, centrifugados por 10 minutos a 11.200 g; O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, e deixado secar em temperatura ambiente; O DNA isolado foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + (RNase 1,0 µL/ amostra) e as amostras foram colocadas na estufa a 37°C para completa solubilização do DNA (30-60 minutos) e, posteriormente, conservado a -20 °C.

A partir do DNA da cultivar 'BRS Platina', a sequência relativa às regiões dos genes (Foc1 e Foc2) foram obtidas via amplificação das mesmas utilizando-se primers específicos (Apêndice A) com os sítios de digestão das enzimas, que foram utilizadas para a clonagem no

vetor pCAMBIA1391z e no vetor PTF102. Para a PCR foi utilizada a enzima Platinum<sup>®</sup> *Taq* polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador termociclador (Applied Biosystems/ProFlex<sup>™</sup> 96-well) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação compostos das 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, temperatura média do par de primers por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Seguido por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C. Após a amplificação, o produto de PCR foi colocado em gel de agarose 1,5% e tampão TBE 1X, para a verificação do tamanho do fragmento obtido as bandas foram observadas no transluminador e fotodocumentador (L. Pix - Loccus Biotecnologia<sup>®</sup>). Depois da confirmação, o produto de PCR dos dois promotores amplificados foi purificado com o kit GFX PCR DNA and gel band purification da GE Healthcare<sup>®</sup>, segundo recomendações do fabricante.

### 4.3 Obtenção dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102

Após seleção dos dois vetores para a clonagem, a preparação dos mesmos foi iniciada. A partir de um tubo estoque das bactérias contendo o vetor pCAMBIA1391z, armazenado a -80 °C, uma alíquota foi retirada e estriada em placas de meio semi-sólido LB contendo canamicina (50 mg/L) e incubadas a 37 °C overnight. Uma colônia isolada de cada placa foi retirada e colocada em 5 mL de meio LB líquido contendo canamicina (50 mg/L) em um tubo falcon de 15 mL e colocados para crescer a 37 °C, sob agitação a 4 g, overnight. Em seguida, centrifugou-se o meio contendo o vetor a 4 °C, por 4.000 g e 15 minutos e em seguida foi extraído o DNA plasmidial com o kit PureLink<sup>™</sup> HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen<sup>®</sup>, EUA), conforme recomendações do fabricante.

O vetor PTF102 foi cedido pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais), acondicionado em disco de papel filtro. Para a recuperação do DNA plasmidial o disco foi dividido em quatro partes e cada uma foi colocada em um microtubo contendo 50 µL de água ultrapura autoclavada, permanecendo em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados por 10 segundos e incubados por 30 minutos a 37 °C, posteriormente foram centrifugados por 1 min e o papel foi retirado com pinça estéril. Deste volume recuperado, 10 µL do DNA plasmidial do vetor foi utilizado para transformar células competentes seguindo as instruções do kit One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen<sup>®</sup>). Em seguida, o mix da transformação foi plaqueado em meio LB contendo espectinomicina (50 mg/L). Após o crescimento (37 °C por 16 horas) uma única colônia de cada placa foi retirada e colocada em 5 mL de meio LB líquido contendo espectinomicina (50 mg/L) em um tubo falcon de 15 mL e

colocados para crescer a 37 °C, sob agitação a 4 g, overnight. Após centrifugação do meio contendo o vetor a 4 °C a 4.000 g por 15 min, o DNA plasmidial foi extraído com o kit PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep (Invitrogen®), conforme recomendações do fabricante.

Uma vez obtidos os vetores, foi realizada a digestão dos mesmos, para inserir os sítios de restrição correspondentes para o promotor e para os genes. Para isso, procedeu-se a digestão conforme as tabelas 1, 2 e 3. O mix foi incubado a 37 °C overnight.

Tabela 1 - Reação para a digestão do vetor pTF102 com a enzima *SspI*.

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µL)</b>
pTF102 (500 ng/µL)	20,0
Tampão 10X	5,0
Enzima <i>SspI</i>	2,5
Água	22,5
<b>Volume Total</b>	<b>50,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 2 - Reação para a digestão do vetor pCAMBIA1391z com as enzimas *AvrII* e *Bg/II*.

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µL)</b>
pCAMBIA1391z (500 ng/µL)	20,0
Tampão 10X	10,0
Enzima <i>AvrII</i>	5,0
Enzima <i>Bg/II</i>	2,5
Água	12,5
<b>Volume Total</b>	<b>50,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 3 - Reação para a digestão do vetor pCAMBIA1391z com as enzimas *AvrII* e *PmlI*.

<b>Reagente</b>	<b>Volume (µL)</b>
pCAMBIA1391z (500 ng/µL)	20,0
Tampão 10X	5,0
Enzima <i>AvrII</i>	5,0
Enzima <i>PmlI</i>	5,0
Água	15,0
<b>Volume Total</b>	<b>50,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Após a digestão dos vetores, 5 µL foram colocados em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X para confirmar a digestão por eletroforese. Após o resultado, o restante foi purificado com o kit ‘GFX PCR DNA and gel band purification’ da GE Healthcare®, conforme instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a etapa de desfosforilação para cada vetor conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Mix para a desfosforilação dos plasmídeos com a enzima CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*).

Reagente	Volume (µL)
Vetor	44,0
CIAP	1,0
Tampão	5,0
<b>Volume Total</b>	<b>50,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Este mix foi incubado a 37 °C overnight e em seguida utilizado o kit ‘GFX PCR DNA and gel band purification’ da GE Healthcare® para purificação. Após desfosforilação e purificação, foram feitos os procedimentos de ligação dos vetores e os respectivos insertos separadamente (promotores e genes) (tabelas 5, 6 e 7). Para o cálculo da concentração de inserto a ser utilizado, considerou-se o tamanho do vetor e o tamanho do inserto. As reações de ligação foram incubadas a 16 °C overnight.

Tabela 5 - Mix para as reações de ligação entre pCAMBIA1391z e pFull (promotor completo) e entre pCAMBIA1391z e pCore (promotor parcial).

Reagente	Vol. (µL)	Reagente	Vol. (µL)
pCambia1391z (27 ng) – <i>AvrII</i> + <i>BglII</i>	4,0	pCambia1391z (27 ng) – <i>AvrII</i> + <i>BglII</i>	4,0
Insertos: pFull (100 ng)	1,0	Insertos: pCore (48 ng)	2,0
Tampão da Ligase	2,0	Tampão da Ligase	2,0
Ligase	1,0	Ligase	1,0
Água	12,0	Água	11,0
<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>	<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 6 - Mix para as reações de ligação entre pCAMBIA1391z e Foc1 e entre pCAMBIA1391z e Foc2.

Reagente	Vol. (µL)	Reagente	Vol. (µL)
pCambia1391z (35 ng) – <i>AvrII</i> + <i>PmlI</i>	3,0	pCambia1391z (35 ng) – <i>AvrII</i> + <i>PmlI</i>	3,0
Insertos: Foc1 (71 ng)	1,5	Insertos: Foc2 (34 ng)	9,0
Tampão da Ligase	2,0	Tampão da Ligase	2,0
Ligase	1,0	Ligase	1,0
Água	12,5	Água	5,0
<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>	<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

Tabela 7 - Mix para as reações de ligação entre pTF102 e Foc1 e entre pTF102 e Foc2.

Reagente	Vol. (µL)	Reagente	Vol. (µL)
pTF102 (15 ng) – SSPI	14,0	pTF102 (15 ng) – SSPI	7,0
Insertos: Foc1 (79 ng)	3,0	Insertos: Foc2 (14 ng)	10,0
Tampão da Ligase	2,0	Tampão da Ligase	2,0
Ligase	1,0	Ligase	1,0
<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>	<b>Volume Total</b>	<b>20,0</b>

Fonte: Do autor (2018).

#### 4.4 Transformação dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102 com seus respectivos insertos

Para a transformação dos vetores foi utilizado o kit One Shot<sup>®</sup> TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, Califórnia, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Foram plaqueadas duas alíquotas distintas do mix da transformação, uma com 50 µL e outra com 250 µL, ambas em placas de 25 mL de meio semi-sólido LB contendo canamicina (50 mg/L) para o vetor pCAMBIA1391z e meio semi-sólido LB contendo espectinomomicina (50 mg/L) para o vetor pTF102 e incubadas em estufa a 37 °C overnight.

Após a etapa anterior, nas placas com os vetores transformados foram selecionadas as colônias individuais existentes e inoculadas para multiplicação em meio LB líquido, contendo os antibióticos adequados para cada vetor, a 37 °C overnight, sob agitação (3 g). Ao mesmo tempo, com as mesmas colônias selecionadas, foram feitas PCR com primers específicos (Apêndice A) para pré-selecionar os clones seguramente positivos. Para a PCR foi utilizada a enzima Platinum<sup>®</sup> Taq polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador termociclador (Applied Biosystems/ProFlex<sup>™</sup> 96-well) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação compostos das 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, temperatura média do par de primers por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Seguido por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Para as colônias que, via PCR, foram dadas como positivas, 100 µL de cada cultura fora colocada novamente para multiplicar em volume maior de meio LB líquido com seu respectivo antibiótico, overnight a 37° C sob agitação (3 g). Do volume total da suspensão, 1 mL foi separado para fazer o estoque em glicerol (50%) a -80° C, e o restante foi utilizado para extrair o DNA através de *mini-prep*.

Outra forma utilizada para a detecção do gene uidA (gene da β-glucuronidase) em *Escherichia coli* foi utilizando o 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-dglucuronide (X-GlcA), adequado como substrato para β-glucuronidase. As células de *Escherichia coli* transformadas foram



estriadas em placas separadas de meio LB contendo 1% (p/v) de peptona, 0,5 % (p/v) extrato de levedura, 0,5 % de NaCl, 0,7 % de ágar e 0,37 mg/mL de X-GlcA. Entre 24 e 48 horas, as colônias produziram coloração azul, indicando a expressão do gene da  $\beta$ -glucuronidase e as colônias que não produziram coloração azul indicaram a ausência de expressão.

#### **4.5 Preparo de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 e transformação via choque térmico**

Uma colônia isolada da cepa de *A. tumefaciens* receptora EHA 105 foi coletada e transferida para 5 mL de meio LB acrescido de rifampicina (100 mg/L). A cultura foi incubada em BOD a 28° C, com agitação rotativa (3 g), overnight.

Após este período, 2 mL da cultura anterior foi inoculada em 50 mL de meio LB acrescido de rifampicina (100 mg/L) e, novamente, incubado a 28 °C sob agitação de 3 g até que atingisse DO (Densidade Óptica) entre 0,5 a 1,0 (A600 nm). Logo que a DO<sub>600</sub> foi atingida, a suspensão foi colocada em gelo por alguns minutos e, centrifugada a 1.792 g por 8 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de CaCl<sub>2</sub> (20 mM) gelado. Alíquotas de 0,1 mL foram distribuídas em microtubos de 2 mL que foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados para conservação a -80° C.

Para a transformação, os tubos contendo as células congeladas foram colocados no gelo por 5 minutos; Em seguida, aproximadamente 1  $\mu$ g de DNA de cada plasmídeo recombinante foi adicionado ao tubo com as células competentes e o mix foi congelado no ultra freezer (-80 °C). Posteriormente, o material foi incubado em banho seco a 37 °C por 5 minutos e rapidamente transferidos para o gelo por 30 minutos. Em seguida, alíquotas de 15, 30 e 50  $\mu$ L do mix da transformação foram plaqueadas em meio LB contendo os antibióticos apropriados. Após 4 dias de incubação a 28 °C foram identificadas colônias isoladas.

Foram selecionadas as colônias individuais existentes e colocadas para multiplicação em meio LB líquido, contendo os antibióticos adequados, a 28 °C overnight, sob agitação (3 g). Ao mesmo tempo, com as mesmas colônias selecionadas, foram feitas PCR usando primers específicos (Apêndice A) para confirmar as colônias positivas. Para a PCR foi utilizada a enzima Platinum<sup>®</sup> Taq polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>), seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador (Applied Biosystems/ProFlex<sup>™</sup> 96-well) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação compostos das 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, temperatura média do par de primers por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Seguido por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Para as colônias que, via PCR, foram confirmadas como positivas, 100 µL de cada colônia crescida foi colocada novamente para crescer em 10 mL de meio LB líquido com seus respectivos antibióticos, a 28 °C sob agitação (3 g), overnight ou até que atingisse a DO<sub>600</sub> entre 0,5 e 0,8. Do volume total da suspensão, 1 mL foi separado para fazer o estoque em glicerol (50%) a -80 °C e o restante foi utilizado para a próxima etapa da transformação genética.

#### **4.6 Transformação genética de *Nicotiana tabacum* para validar promotor Prom\_Musa\_Embrapa\_005 e genes (Foc1 e Foc2)**

Sementes de *N. tabacum* cv. SRI, cedidas pela Embrapa Agroenergia (Brasília, DF), foram submetidas à assepsia em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool 70% por 1 minuto e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos. Após seis enxágues com água pura autoclavada, foram inoculadas em placas com meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). A germinação iniciou aos seis dias após a inoculação.

A transformação genética da planta modelo *N. tabacum* para validar os dois genes candidatos e a sequência potencialmente promotora de expressão gênica para raiz foi mediada por *Agrobacterium tumefaciens* com o seguinte protocolo (ARAGÃO et al., 2002).

##### **4.6.1 – Preparo da cultura de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem EHA105**

A partir do estoque, 100 µL de cada linhagem de *Agrobacterium* EHA105 contendo os vetores binários com os genes de interesse foram inoculados em 50 mL de meio LB contendo os antibióticos rifampicina (100 mg/L) associado a espectinomicina (50 mg/L) para pTF102 e canamicina (50 mg/L) para pCAMBIA1391z. Esta cultura foi incubada por 16 h a 28°C sob agitação a 3 g até a fase exponencial de crescimento ( $A_{600nm} = 1,5$ ). Ao atingirem a DO adequada, as culturas foram então diluídas para uma  $DO_{A600nm} = 0,1$ .

##### **4.6.2 - Transformação de *Nicotiana tabacum* cv. SRI**

Em câmara de fluxo laminar explantes foliares de folhas jovens foram cortados em formato de disco com o auxílio de ponteiras, pinças e lâmina de bisturi estéreis, sobre uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril para manter os explantes hidratados; Um mililitro (1 mL) da cultura diluída de *Agrobacterium* foi adicionada à 10 mL de LB líquido; Em seguida, os explantes foliares também foram adicionados e a co-cultura foi mantida à temperatura ambiente por 5 minutos sob leve agitação. Os explantes foram transferidos para placas de Petri com papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactérias;

Posteriormente, os discos foram inoculados com a face adaxial em contato com o meio MS gelificado suplementado com 0,3% de sacarose e 1 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP); o material foi mantido em incubadora BOD por 48 horas a 28°C na ausência de luz.

#### **4.6.3 - Regeneração das plantas transformadas**

Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de regeneração MS suplementado com 0,3% de sacarose e 2 mg/L de BAP, combinado com 300 mg/L de cefotaxima. Mantendo as placas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 h à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . O meio de regeneração também continha os antibióticos de seleção adequados (espectinomicina para o vetor pTF102 e canamicina para pCAMBIA1391z); Os explantes foram cultivados por duas semanas até a calogênese. Os calos foram repicados e transferidos para novo meio de regeneração contendo agente seletivo; Os brotos regenerados, com aproximadamente 2 cm, foram transferidos para frascos de vidro com capacidade de 125 mL contendo 30 mL de meio de enraizamento, MS suplementado com 0,1 mg/L de Ácido naftalenoacético (ANA) suplementado com 0,3% de sacarose, contendo o antibiótico adequado para cada vetor. Foram necessárias trocas de meio a cada duas semanas para a individualização de brotos até o enraizamento; Brotos enraizados (com 8-10 cm de comprimento) foram transferidos para sacos de terra adubada e estéril (2,5 L); As plantas foram cobertas por 4 dias com sacos de plástico transparente, com furos, para formação de câmara úmida e mantidas em casa de vegetação com irrigação por nebulização.

#### **4.7 Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática $\beta$ -glucuronidase (GUS)**

Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase (GUS) foram realizados em folhas e raízes de *N. tabacum* transformadas, sendo considerado um evento por construção escolhido totalmente ao acaso. Segmentos foliares e radiculares foram colocados em solução contendo o substrato da enzima X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -glucuronídeo) (Sigma-Aldrich).

A solução foi preparada utilizando fosfato de sódio 100 mM pH 7.0, ferrocianeto de potássio 0,5 mM, 0,1 % de Triton<sup>®</sup> X-100, EDTA 10 mM pH 7.0 e X-glucA – 1 mM dissolvido em 1 mL de DMSO. Os tecidos foram incubados na mesma durante 24 horas a 37 °C em incubadora BOD. Em seguida, foram feitas lavagens em solução de etanol 70 % (v/v) durante 48 horas, para a remoção da clorofila a fim de facilitar a observação da coloração azul nos casos positivos.

#### 4.8 Extração de DNA

O DNA genômico de folhas de *N. tabacum* foi extraído pelo método de Doyle e Doyle (1987) modificado como descrito a seguir. Uma vez as amostras coletadas, foram acondicionadas em tubos falcons de 50 mL, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80° C, até o momento da extração.

O tecido vegetal foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido e em seguida adicionado 1 mL do tampão de extração (CTAB 2,0 %, NaCl 1,7 M, Tris HCL 0,1 M - pH 8,0, EDTA 20 mM, β-mercaptoetanol 0,4 % e PVP 2,0 %); O volume total foi transferido para microtubos de 2 mL e homogeneizado em vortex durante 5 seg. Posteriormente, os microtubos foram incubados em Banho Maria a 65° C entre 45 e 60 min, sendo homogeneizado a cada 10 min; Após retirados do banho Maria foram resfriados em gelo e em seguida adicionado 800 µL de Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizado rapidamente; O material foi centrifugado por 10 min a 11.200 g; Aproximadamente 800 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos de 1,5 mL devidamente identificados; Para a precipitação do DNA foi adicionado 600 µL de Álcool Isopropílico (gelado), homogeneizando suavemente; Os tubos foram incubados a -20 °C por 60 minutos e em seguida centrifugados por 10 min a 11.200 g; O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, e mantido em temperatura ambiente para secar; O DNA foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) + 1,0 µL/ amostra de RNase (10 mg/mL).

Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro em Espectrofotometro UV-Vis, NanoDrop 2000c (Thermo Scientific™) pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 260 nm e em seguida o DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade.

Para verificar a integração do T-DNA nas amostras de DNA genômico extraído das plantas transformadas, reações de PCR foram realizadas utilizando primers internos desenhados especificamente para as sequências de interesse. Para a PCR foi utilizada a enzima Platinum® *Taq* polimerase (Invitrogen®), seguindo o protocolo do fabricante. As reações foram incubadas no termociclador termociclador (Applied Biosystems/ProFlex™ 96-well) programado com temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de amplificação compostos das 3 etapas: 95 °C por 30 segundos, temperatura média do par de primers por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos. Seguido por uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C.

#### 4.9 Extração de RNA

Folhas e raízes de *N. tabacum* transformadas geneticamente foram coletadas, acondicionadas em tubos falcons, congeladas em N<sub>2</sub> líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da extração do RNA.

O RNA foi extraído com o kit Pure Link™ RNA (Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante. Durante a extração o material foi mantido em N<sub>2</sub> líquido, para que não houvesse o descongelamento do tecido antes da lise. A eluição do RNA foi realizada adicionando 50 µL de água livre de RNase ao centro da membrana do filtro. O material foi incubado por 1 minuto e em seguida centrifugado a 13.552 g por 2 minutos à temperatura ambiente. O RNA foi mantido no gelo por algumas horas e, posteriormente, armazenado a -80.

A avaliação da integridade do RNA extraído foi feita por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 1X, onde foi possível observar as bandas individuais de RNA ribossomal 28S e 18S. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA) pela leitura da absorbância no comprimento de onda a 260 nm.

#### 4.10 Tratamento com DNase

A fim de assegurar o máximo de pureza para as amostras de RNA extraídas, todas as amostras foram tratadas com o Kit Turbo™ DNase (Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante, para a retirada dos vestígios de DNA genômico que poderia restar nas amostras de RNA. Ao tubo contendo 10 µg do RNA, foram adicionados 5 µL de tampão 10X (fornecido pelo kit) e 1 µL da enzima Turbo DNase. Essa reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos para ativação da enzima. Posteriormente, para inativar a enzima, foi adicionado 15 mM de EDTA (pH 8,0) e a reação foi incubada a 75 °C por 10 minutos.

#### 4.11 Transcriptase reversa (RT)

A síntese reversa da primeira fita do DNA completar (cDNA) foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Os cálculos foram realizados para uma concentração final de aproximadamente 2000 ng de RNA. Em microtubos estéreis adicionou-se o mix contendo 10x RT Buffer (2,0 µL), 25x dNTP Mix 100 mM (0,8 µL), 10x Random Primers (2,0 µL), MultiScribe™ Reverse Transcriptase (1,0 µL), Nuclease-free H<sub>2</sub>O (quantidade suficiente para completar o volume para 20 µL) e RNA (2000 ng). Os tubos foram incubados em termociclador termociclador (Applied Biosystems/ProFlex™ 96-well), a 25 °C por 10 min para a fase de anelamento, a 37 °C por 60 min para a síntese e a 85 °C por 5 min para

inativar a enzima. Posteriormente as amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 4.12 Testes dos Genes de Referência

Os cDNAs sintetizados foram testados por qPCR com os primers dos genes de referência (*housekeepings*) em diluições sequenciais de 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/25 e 1/40. Seguindo o protocolo sugerido pelo Equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Para os testes foram utilizadas uma amostra de cDNA de cada grupo que havia sido sintetizada em duplicata a partir do RNA extraído das plantas transformadas. Dessa forma, foi possível verificar a eficiência das diluições e a especificidade dos primers, analisando a curva de dissociação (*Melt Curve*).

#### 4.13 Ensaio de qPCR

Para cada reação foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  das diluições adequadas de cDNA, 0,2  $\mu\text{L}$  de cada primer forward e reverse (10 mM cada), 5  $\mu\text{L}$  do mix concentrado 2X de Power SYBR® green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 3,6  $\mu\text{L}$  de água ultra pura autoclavada para um volume final de 10  $\mu\text{L}$  por reação. Para obtenção do coeficiente de expressão de cada gene analisado, os valores de expressão foram obtidos por meio da quantificação comparativa usando uma amostra de referência e um controle endógeno para determinar a quantidade relativa de sequência de ácido nucleico alvo nas amostras. Para certificar que o mix utilizado nas reações não contém DNA contaminante, em todas as reações foram utilizados controles negativos (água) para cada gene analisado.

Para a aplicação do método o termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems) foi programado com uma etapa de pré-incubação de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min e, em seguida a etapa de amplificação com 40 ciclos de 15 seg a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 1 min a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os dados foram analisados utilizando o software StepOne™ v2.3 (Applied Biosystems) para determinar o valor do CT (*cycle Threshold*).

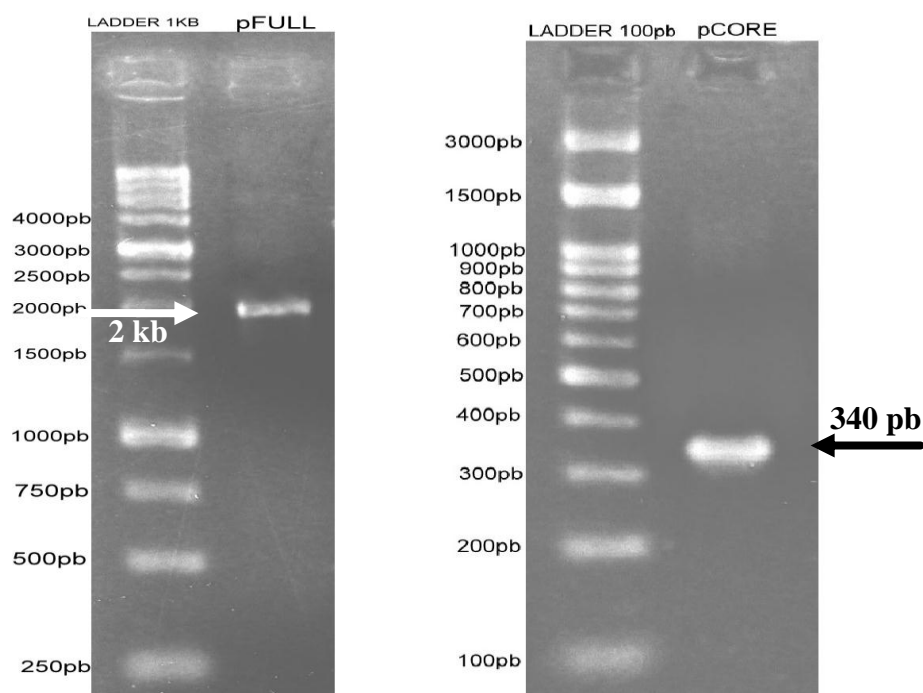
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Confirmação da obtenção da sequência promotora *Prom\_Musa\_Embrapa\_005*

A partir do DNA do clone BAC\_125A12, a sequência relativa às regiões completa e parcial do promotor *Prom\_Musa\_Embrapa\_005* foi obtida via amplificação das mesmas utilizando-se primers específicos (Apêndice A) com os sítios de digestão das enzimas *Avr* II (início) e *Bgl* II (fim). Após a amplificação, o produto de PCR foi colocado em gel de agarose 1,5% e tampão TBE 1X, para a verificação do tamanho do fragmento obtido. Depois da confirmação, o produto de PCR dos dois promotores amplificados foi purificado.

As reações de PCR para obtenção da sequência promotora na versão completa (pFull) foram realizadas utilizando o par de primers P28FU-Fw/*Avr*II e P28-Rv/*Bg*III, e para obtenção da sequência promotora na versão parcial (pCore) o par de primers utilizado foi P28CO-Fw/*Avr*II e P28-Rv/*Bg*III. A análise do gel de agarose permitiu confirmar o tamanho dos fragmentos esperados da sequência promotora na versão completa (2 kb) e parcial (340 pb) (Figura 1).

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da PCR com o DNA do clone BAC\_125A12 para obtenção da sequência promotora *Prom\_Musa\_Embrapa\_005* na versão completa (2kb) e parcial (340pb).



Fonte: Do autor (2018).

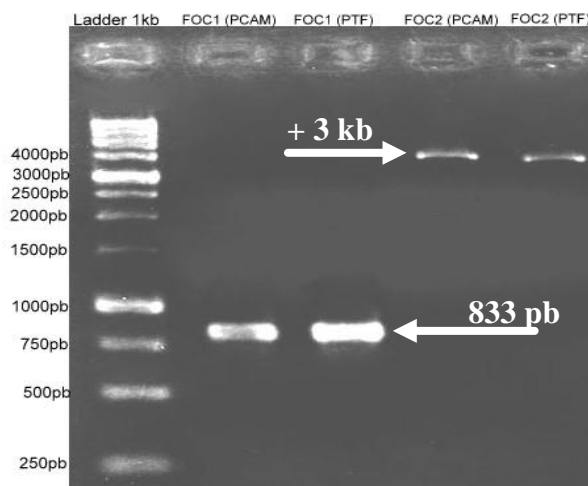
## 5.2 Confirmação da obtenção da sequência dos genes candidatos

A partir do DNA da cultivar ‘BRS Platina’, a sequência relativa às regiões dos genes (Foc1 e Foc2) foram obtidas via amplificação das mesmas utilizando-se primers específicos (Apêndice A) com os sítios de digestão das enzimas, que foram utilizadas para a clonagem no vetor pCAMBIA1391z e no vetor PTF102.

Para obtenção da sequência de Foc1 para pCambia1391z foi utilizado o par de primers FOC1FC+*AvrII* e FOC1RC+*PmlI*; e Foc1 para pTF102 foi utilizado o par de primers FOC1FC+*SspI* e FOC1RC+*SspI*. A análise do gel de agarose (Figura 2) permitiu confirmar o tamanho do fragmento esperado da sequência do gene Foc1 (833 pb).

Para obtenção da sequência de Foc2 para pCambia1391z foi utilizado o par de primers FOC2FC+*AvrII* e FOC2RC+*PmlI*; e Foc2 para pTF102 foi utilizado o par de primers FOC2FC+*SspI* e FOC2RC+*SspI*. O tamanho esperado da sequência do gene Foc2 era de 1842 pb. Mas o fragmento obtido apresentou-se maior (3 kb). Porém, considerando que não houve amplificações inespecíficas e as bandas obtidas estavam nítidas (Figura 2) procedeu-se para a etapa de purificação.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos produtos da PCR com o DNA da cultivar ‘BRS Platina’ para obtenção da sequência dos genes candidatos Foc1 (pCAMBIA1391z e PTF102) e Foc2 (pCAMBIA1391z e PTF102)



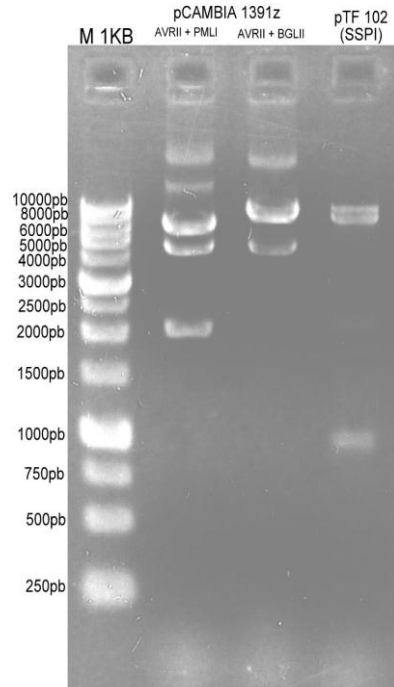
Fonte: Do autor (2018).

## 5.3 Confirmação da digestão dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102

Uma vez obtidos os vetores, foi realizada a digestão dos mesmos, para inserir os sítios de restrição correspondentes para o promotor e para os genes. Após a confirmação da digestão com as enzimas de restrição (Figura 3) procedeu-se para as etapas de desfosforilação e reações de ligação vetor + inserto.



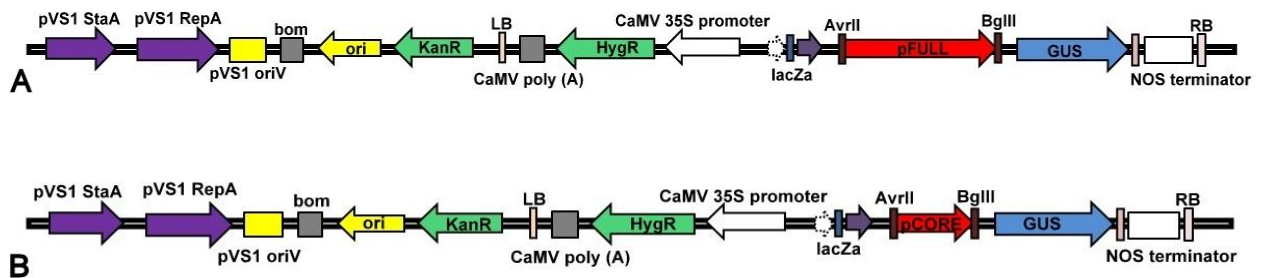
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a digestão dos vetores com enzimas de restrição.



Fonte: Do autor (2018).

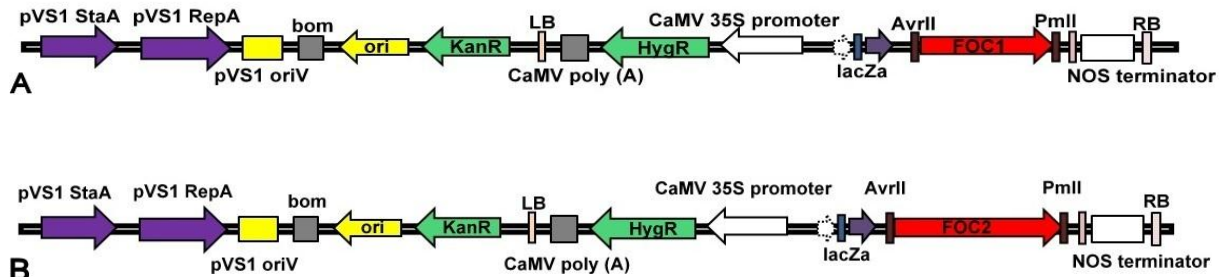
O esquema dos mapas plasmidiais com os respectivos promotores, sítios de restrição e localização dos primers utilizados para o sequenciamento estão nas Figuras 4 a 6. O desenho dos mapas lineares foi feito com base nas figuras dos plasmídeos pCAMBIA1391z e pTF102 (Anexo A e B).

Figura 4 – Mapa linear do vetor pCAMBIA1391z com os promotores Prom\_Musa\_Embrapa\_005 nas versões pFull (A) e pCore (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.



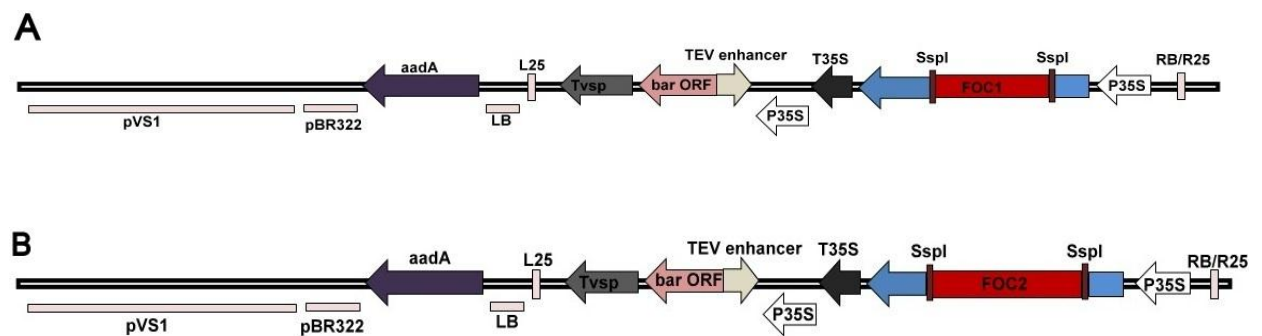
Fonte: Do autor (2018).

Figura 5 - Mapa linear do vetor pCAMBIA1391z com os genes Foc1 (A) e Foc2 (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.



Fonte: Do autor (2018).

Figura 6 - Mapa linear do vetor pTF102 com os genes Foc1 (A) e Foc2 (B), com os sítios de restrição das enzimas utilizadas.



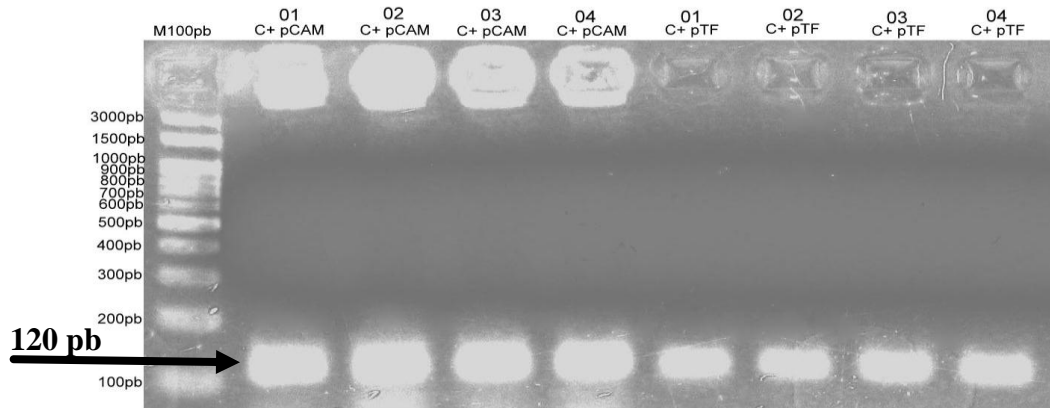
Fonte: Do autor (2018).

#### 5.4 Confirmação da transformação dos vetores pCAMBIA1391z e pTF102, com seus respectivos insertos em *E. coli*

Para selecionar os clones positivos foi feita uma PCR das colônias usando primers específicos (Apêndice A). As colônias que, via PCR, foram confirmadas como positivas (presença do inserto) foram colocadas para crescer em meio de cultura líquido, com seu respectivo antibiótico, para posterior extração do DNA plasmidial através de *mini-prep*.

Para confirmar a presença dos vetores pCambial391z (controle positivo) e pTF102 (controle positivo) na *E. coli* transformada foi utilizado o par de primers GUSF/GUSR para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 7) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 120 pb.

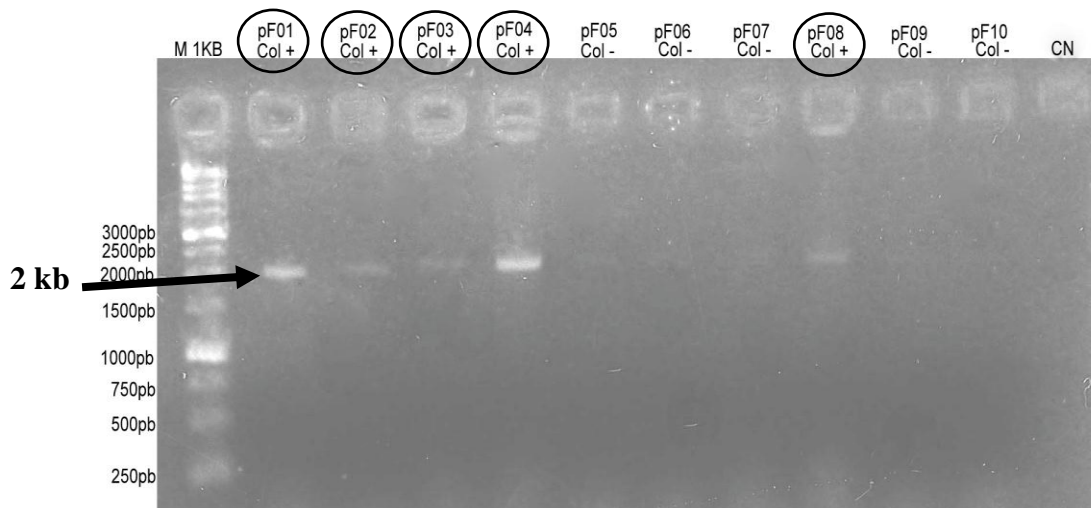
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *E. coli*. transformadas com os vetores pCambia1391z (C+pCAM ) e com pTF102 (C+ pTF).



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do promotor tecido específico na versão completa (pFull) na *E. coli* transformada foi utilizado o par de primers P28FU-Fw/ P28-Rv para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 8) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 2000 pb em algumas colônias (Col+). Somente colônias positivas foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial, as demais foram descartadas.

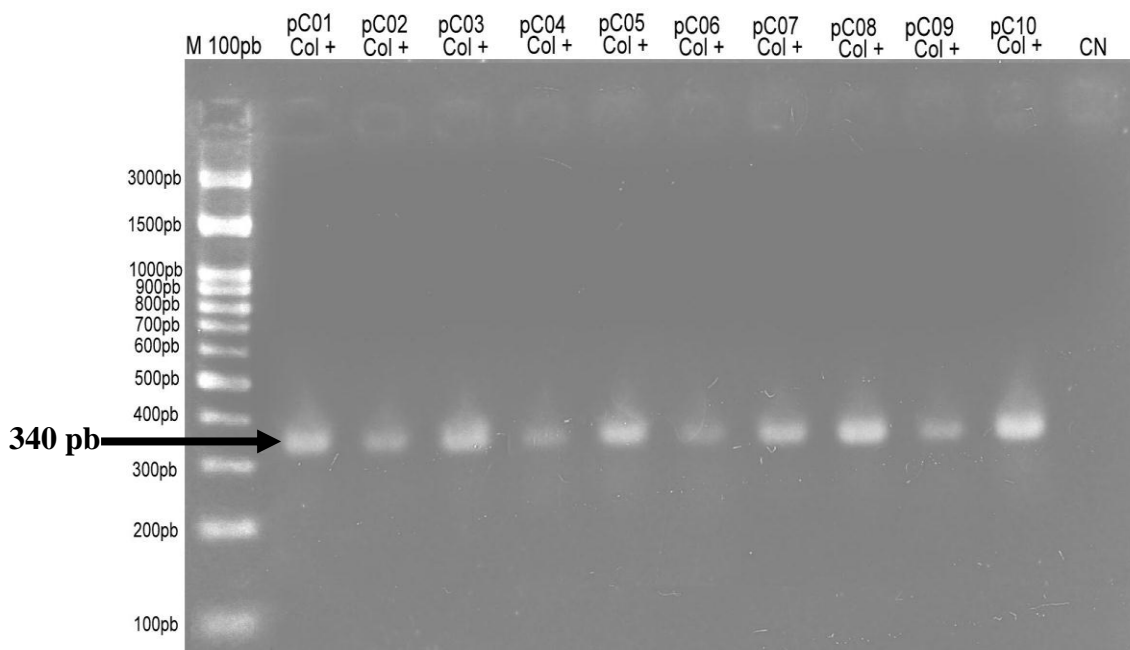
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *E. coli*. transformadas com pCambia1391z + pFull.



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do promotor tecido específico na versão parcial (pCore) na *E. coli* transformada foi utilizado o par de primers P28CO-Fw/ P28-Rv para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 9) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 340 pb em todas as colônias testadas (Col+). Algumas colônias positivas foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial.

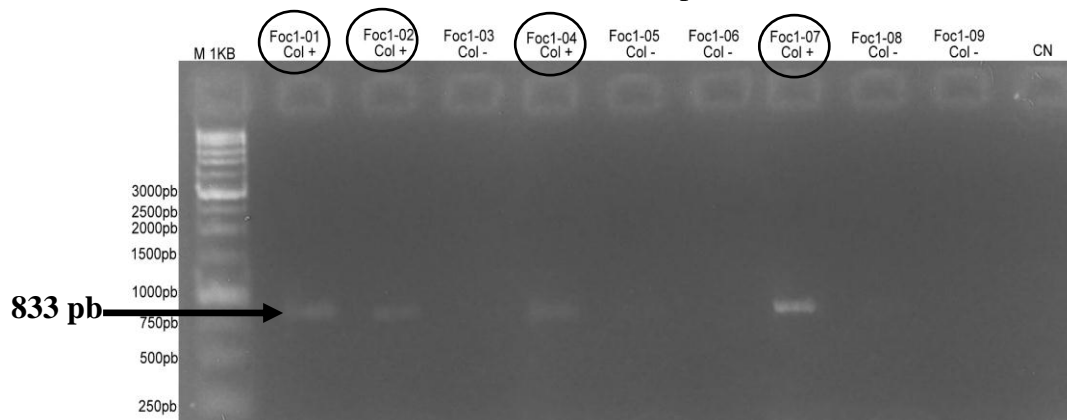
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *E. coli*. transformadas com pCambia1391z + pCore.



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do gene *Foc1* na *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante (pCambia1391z + *Foc1*) foi utilizado o par de primers FOC1-FC+AvrII/ FOC1-RC+*PmlI* para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 10) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 833 pb em algumas colônias (Col+). Somente colônias positivas foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial, as demais foram descartadas.

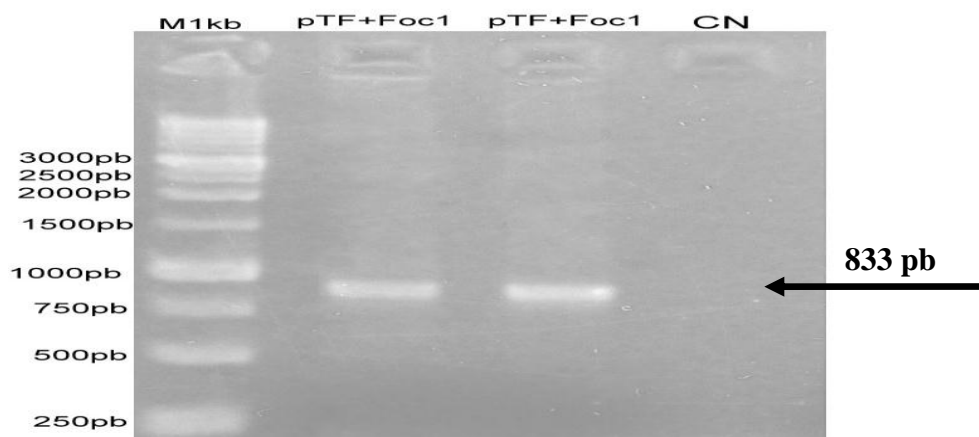
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *E. coli* transformadas com pCambia1391z + Foc1.



Fonte: Do autor (2018).

Não foi possível confirmar a presença do gene Foc1 na *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante (pTF102 + Foc1) através da PCR com colônias. Neste caso, duas colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente e colocadas para crescer em meio LB líquido com seu respectivo antibiótico de seleção. Após a extração do DNA plasmidial das duas amostras realizou-se nova PCR. Dessa forma através da análise do gel de agarose (Figura 11) foi possível identificar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 833 pb nas duas amostras. As mesmas foram utilizadas para a transformação seguinte em *A. tumefaciens* EHA 105.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com o DNA plasmidial da *E. coli* transformada com pTF102 + Foc1.



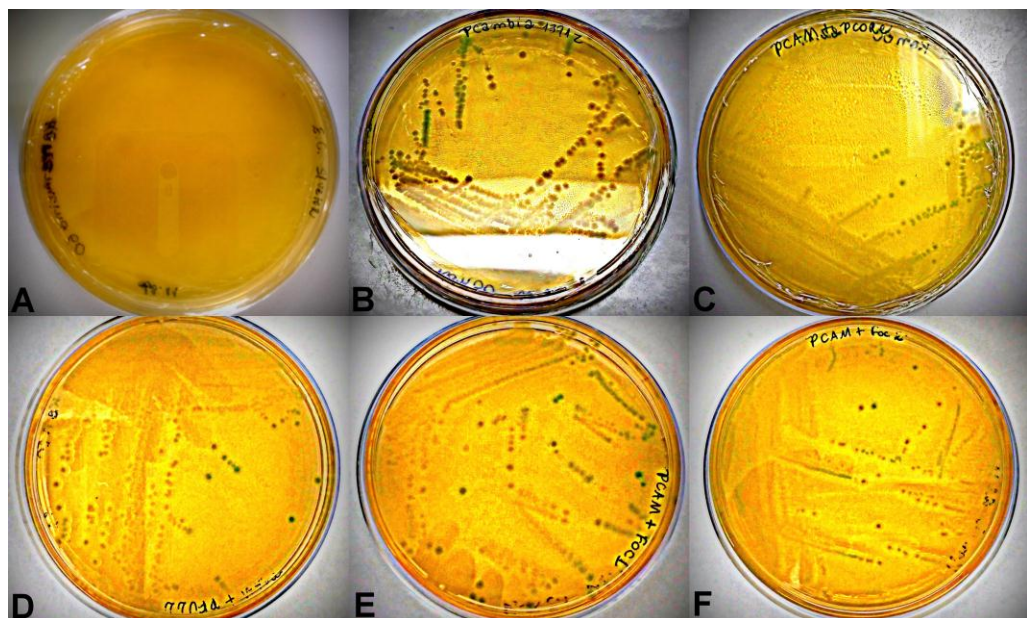
Fonte: Do autor (2018).

Para os plasmídeos recombinantes contendo o gene Foc2, tanto em pCambia1391z quanto em pTF102, não foi possível obter a visualização clara do fragmento em gel de agarose após as

PCRs realizadas, porém obteve-se resultados no teste para a detecção do gene uidA (gene da  $\beta$ -glucuronidase) com a *E. coli* transformada (Figuras 12 e 13).

A detecção do gene uidA (gene da  $\beta$ -glucuronidase) em *E. coli* foi utilizando o 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  $\beta$ -dglucuronide (X-GlcA), adequado como substrato para  $\beta$ -glucuronidase. Após 48 horas, as colônias produziram coloração azul, indicando a expressão do gene da  $\beta$ -glucuronidase e as colônias que não produziram coloração azul indicaram a ausência de expressão.

Figura 12 - Placas com meio LB e antibiótico de seleção canamicina (50 mg/L) 48 horas após o teste para a detecção do gene uidA (gene da  $\beta$ -glucuronidase) em *Escherichia coli*.



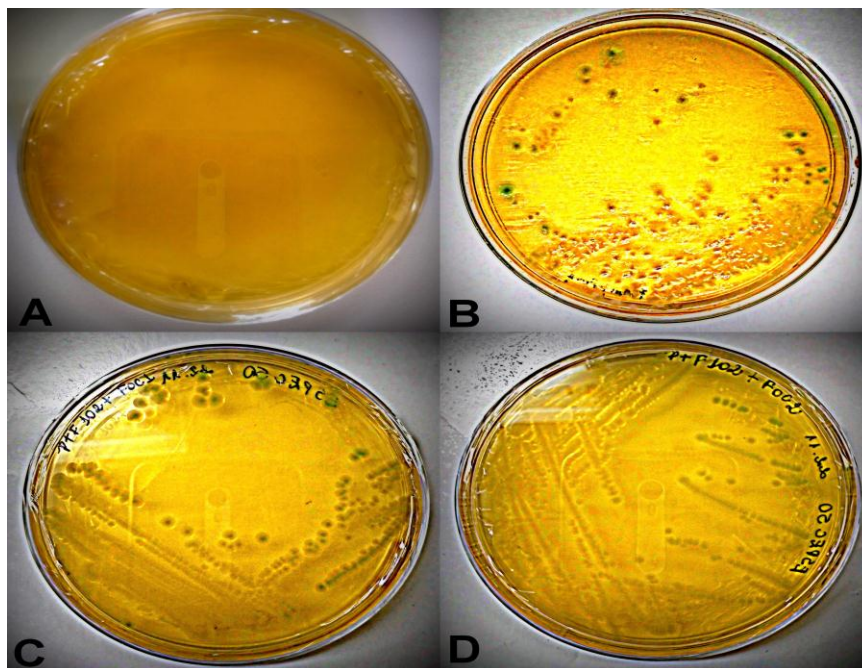
Legenda: (A) *E. coli* não transformada. (B) *E. coli* transformada apenas com o vetor pCambia1391z. (C) *E. coli* transformada com construção pCambia1391z + pCore. (D) *E. coli* transformada com construção pCambia1391z + pFull. (E) *E. coli* transformada com construção pCambia1391z + Foc1. (F) *E. coli* transformada com construção pCambia1391z + Foc2. Fonte: Do autor (2018).

Não houve o aparecimento de colônias na placa com o antibiótico de seleção (canamicina 50 mg/L) contendo a *E. coli* não transformada (Figura 12 A). A placa contendo a *E. coli* com o vetor pCambia1391z íntegro (Figura 12 B) apresentou colônias, em sua maioria de coloração azul, o que confirma a transformação da *E. coli* com o vetor contendo o gene de resistência a canamicina, assim como o gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS) regulado pelo promotor constitutivo CaMV 35S. As placas com a bactéria transformada com o plasmídeo recombinado pCambia1391z + pFull e pCambia1391z + pCore (Figuras 12 C e D) também apresentaram colônias azuis, o que indica expressão do gene GUS regulado pelos promotores (pFull e pCore).



As placas com a *E. coli* transformadas com os plasmídeos recombinados com os genes de resistência a fusariose apresentaram colônias brancas e azuis (Figuras 12 E e F). Neste caso, as colônias selecionadas foram as colônias brancas, já que os genes Foc1 e Foc2 foram clonados na posição (substituindo) do gene GUS, tanto nas construções feitas com o vetor pCambia1391z quanto para as construções feitas com o vetor pTF102 (Figuras 13 C e D).

Figura 13 – Placas com meio LB e antibiótico de seleção espectinomicina (50 mg/L) 48 horas após o teste para a detecção do gene uidA (gene da  $\beta$ -glucuronidase) em *Escherichia coli*.



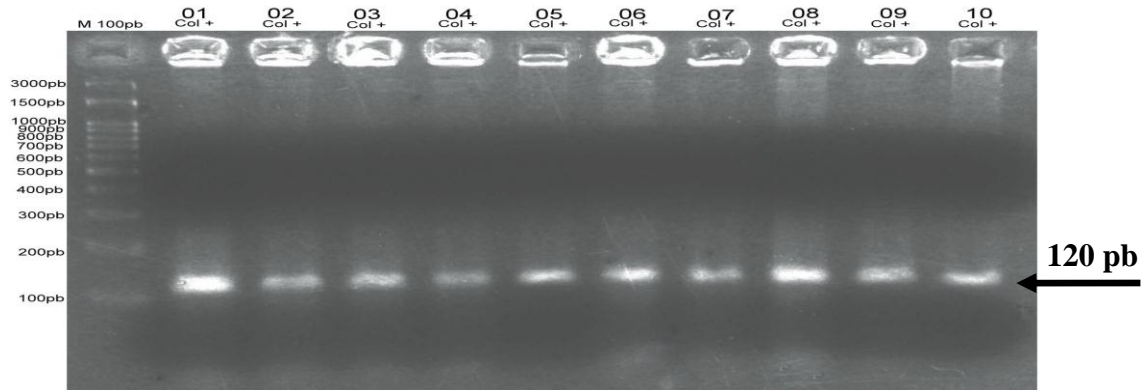
Legenda: (A) *E. coli* não transformada. (B) *E. coli* transformada apenas com o vetor pTF102. (C) *E. coli* transformada com a construção pTF102 + Foc1. (D) *E. coli* transformada com a construção pTF102 + Foc2. Fonte: Do autor (2018).

Não houve o aparecimento de colônias na placa com o antibiótico de seleção (espectinomicina 50 mg/L) contendo a *E. coli* não transformada (Figura 13 A). A placa contendo a *E. coli* com o vetor pTF102 íntegro (Figura 13 B) apresentou colônias, em sua maioria de coloração azul, o que confirma a transformação da *E. coli* com o vetor contendo o gene de resistência a espectinomicina, assim como o gene da  $\beta$ -glucuronidase (GUS). As placas com a *E. coli* transformada com os plasmídeos recombinados pTF102 + Foc1 e pTF102 + Foc2 apresentaram colônias brancas e azuis (Figuras 13 C e D).

### 5.5 Confirmação da transformação dos plasmídeos recombinantes em *Agrobacterium tumefaciens*

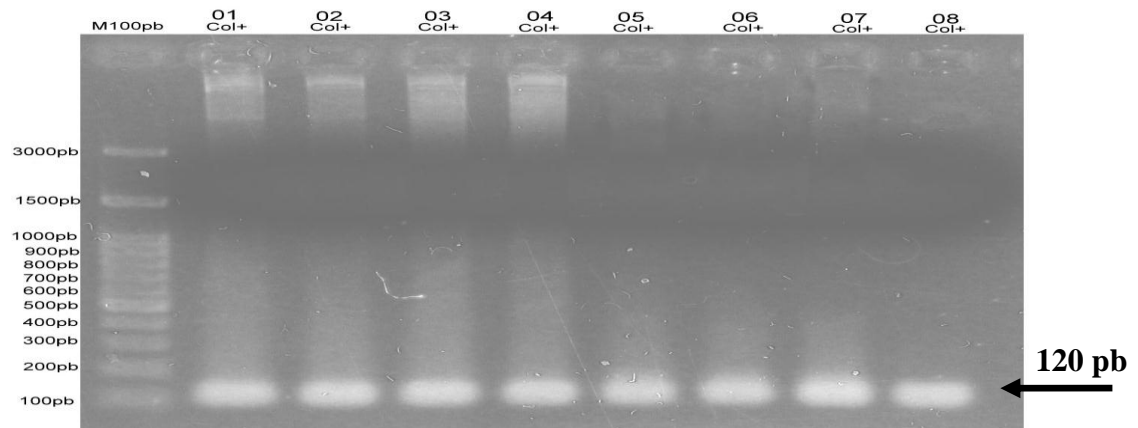
Confirmados os plasmídeos recombinantes clonados em *E. coli* estes foram usados para transformar *A. tumefaciens* EHA 105. A confirmação do DNA plasmidial inserido nas colônias transformadas de *A. tumefaciens* foi verificada por reações de PCR usando os primers específicos (Apêndice A). Para confirmar a presença dos vetores pCambia1391z (Controle positivo) e pTF102 (Controle positivo) na *A. tumefaciens* EHA 105 transformada foi utilizado o par de primers GUSF/GUSR para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figuras 14 e 15) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 120pb.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 transformadas com o vetor pCambia1391z (controle positivo).



Fonte: Do autor (2018).

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 transformadas com o vetor pTF102 (controle positivo - pTF).

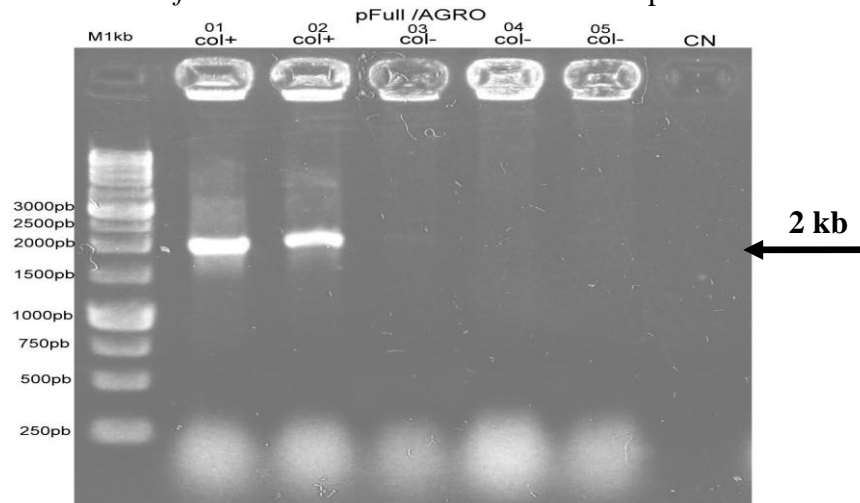


Fonte: Do autor (2018).



Para confirmar a presença do promotor tecido específico na versão completa (pFull) na *A. tumefaciens* EHA 105 transformada foi utilizado o par de primers P28FU-Fw/ P28-Rv para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 16) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 2000 pb em duas das colônias testadas (Col+).

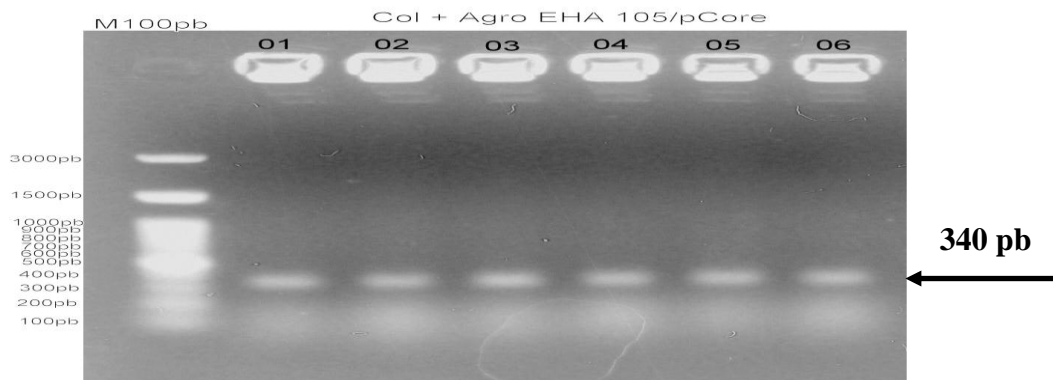
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 transformadas com pCambia1391z + pFull.



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do promotor tecido específico na versão parcial (pCore) na *A. tumefaciens* EHA 105 transformada foi utilizado o par de primers P28CO-Fw/P28-Rv para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 17) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 340pb em todas as colônias testadas.

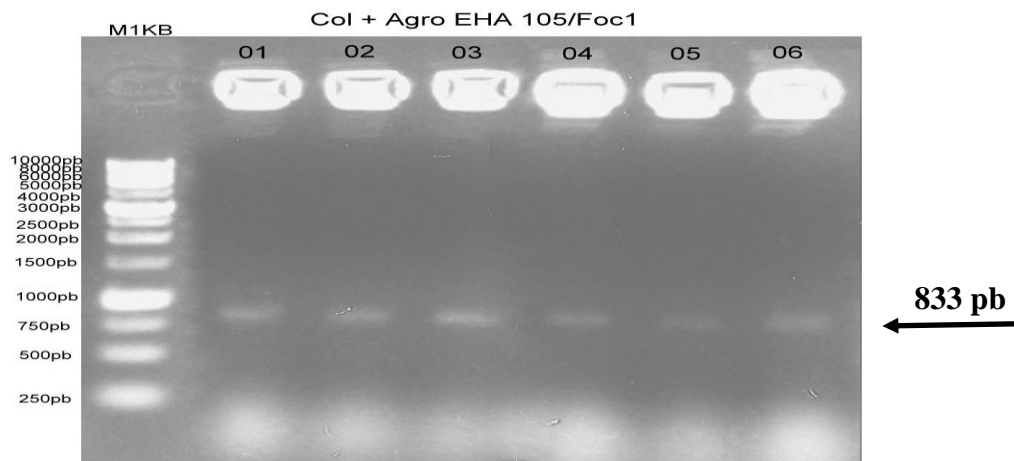
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 transformadas com pCambia1391z + pCore.



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do gene *Foc1* na *A. tumefaciens* EHA 105 transformada com o plasmídeo recombinante (pCambia1391z + *Foc1*) foi utilizado o par de primers FOC1-FC+*AvrII*/FOC1-RC+*PmlI* para a PCR das colônias. A análise do gel de agarose (Figura 18) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 833 pb.

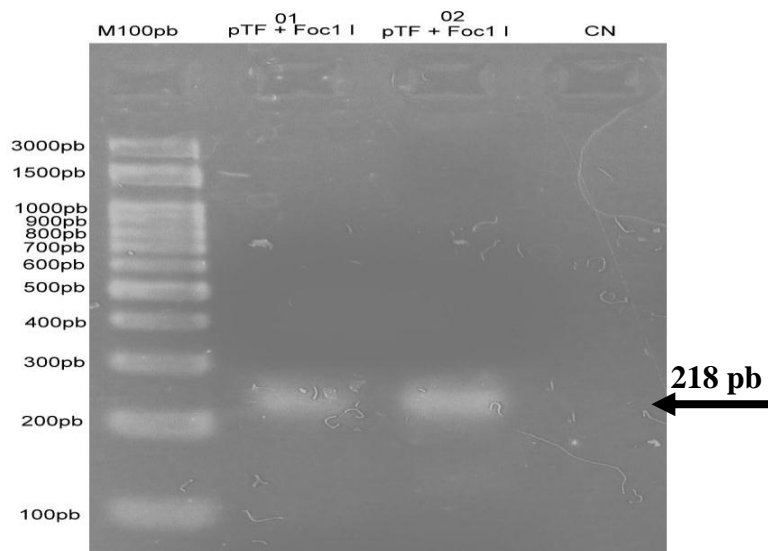
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com as colônias de *A. tumefaciens* EHA 105 transformadas com pCambia1391z + FOC1.



Fonte: Do autor (2018).

Não foi possível confirmar a presença do gene *Foc1* na *A. tumefaciens* EHA 105 transformada com o plasmídeo recombinante (pTF102 + *Foc1*) através da PCR com colônias. Isto pode ter ocorrido por problemas na extração do DNA plasmidial. Neste caso, duas colônias isoladas foram selecionadas aleatoriamente e colocadas para crescer em meio LB líquido com seu respectivo antibiótico de seleção. Após a extração do DNA plasmidial das duas amostras realizou-se nova PCR com primers internos para *Foc1* (FOC1-FI/FOC1/RI). Dessa forma através da análise do gel de agarose (Figura 19) foi possível identificar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 218 pb nas duas amostras analisadas.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR com o DNA de duas amostras de *A. tumefaciens* EHA 105 transformada com pTF102 + Foc1.



Fonte: Do autor (2018).

Para os plasmídeos recombinantes contendo o gene Foc2, tanto em pCambia1391z quanto em pTF102, não foi possível obter a visualização clara do fragmento em gel de agarose após as PCRs realizadas, seja com colônias ou com o DNA da *A. tumefaciens* transformada. Neste caso, como não houve confirmação das transformações com o gene Foc2 o mesmo foi desconsiderado para as demais etapas. Uma vez concluída essas etapas de confirmação das construções presentes em *A. tumefaciens*, essas cepas foram utilizadas para o preparo do inóculo e posterior transformação das plantas de *N. tabacum*.

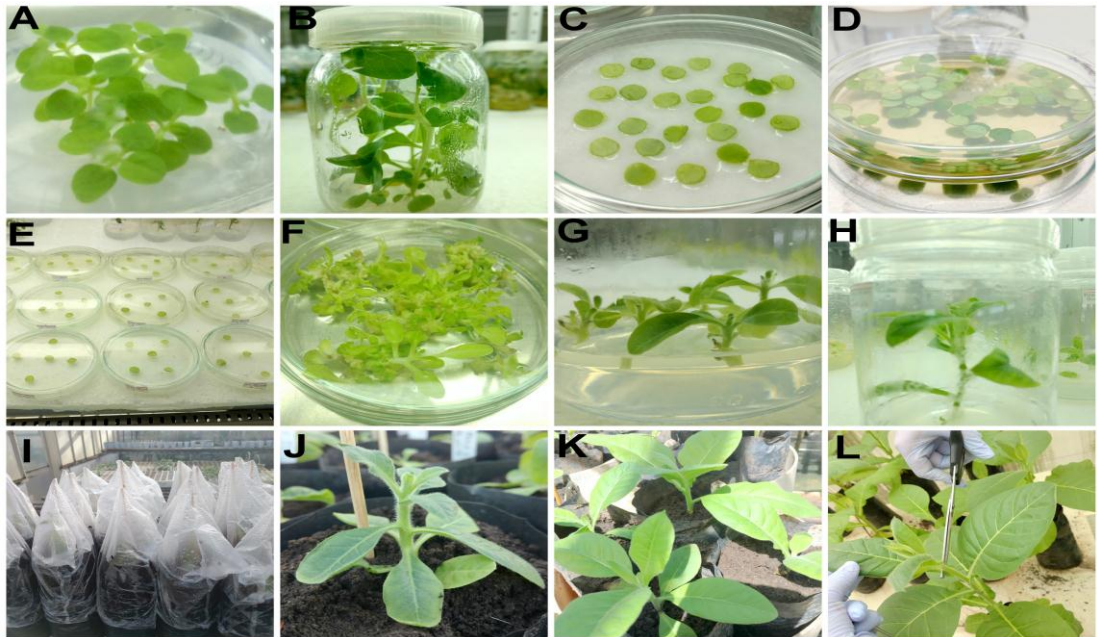
### 5.6 Transformação genética de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para o preparo do inóculo foram utilizadas as cepas *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos recombinados confirmados nas etapas anteriores:

- 1 - Controle positivo 1 (pCambia1391z não modificado);
- 2 - pCambia1391z + pFull do Prom\_Musa\_Embrapa\_005;
- 3 - pCambia1391z + pCore do Prom\_Musa\_Embrapa\_005;
- 4 - pCambia1391z + Foc1;
- 5 - Controle positivo 2 (pTF102 não modificado);
- 6 - pTF102 + Foc1.

Observou-se as etapas do processo de transformação de *N. tabacum* com o plasmídeo pCambia1391z recombinado de maneira simplificada (Figura 20).

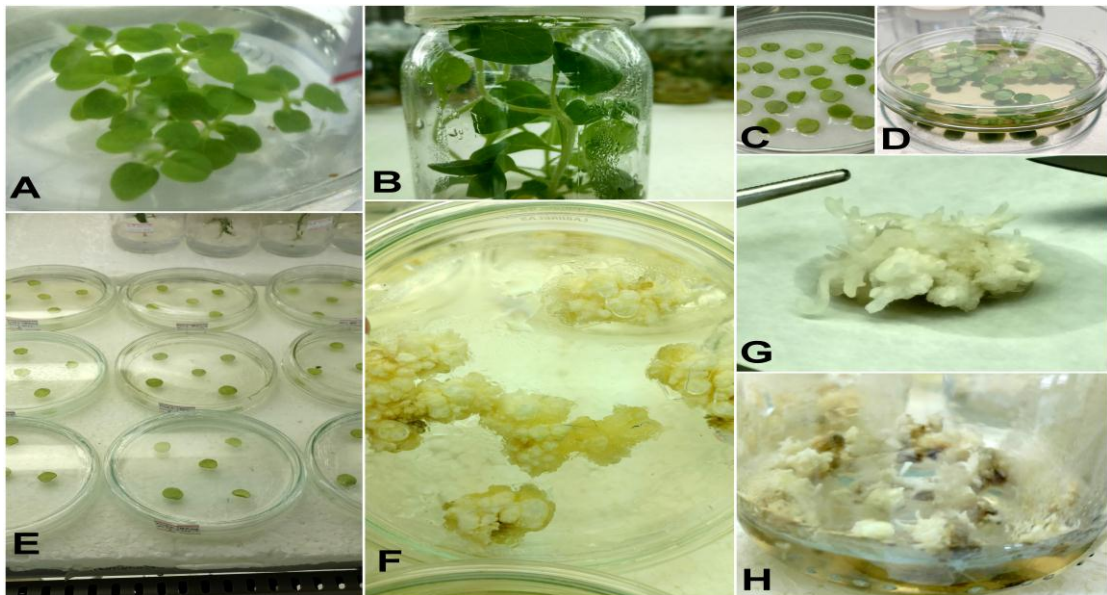
Figura 20 - Etapas da cultura de tecidos envolvendo a transformação de *N. tabacum* com plasmídeos pCambia1391z recombinados.



Legenda: (A) Plântulas obtidas a partir de semente. (B) Planta com folhas maiores, apta para retirada dos discos foliares. (C) Explantes excisados em forma de discos foliares. (D) Co-cultivo em *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos recombinantes. (E e F) Indução de brotos a partir dos discos foliares em meio MS contendo o antibiótico de seleção (canamicina 50 mg/L). (G e H) Individualização dos brotos obtidos para enraizamento e planta apta para a fase de aclimação. (I) Aclimação em casa de vegetação, com auxílio de câmara úmida. (J, K e L) Crescimento e desenvolvimento das plantas. Fonte: Do autor (2018).

Embora os procedimentos e etapas da transformação de *N. tabacum* com plasmídeos recombinados pTF102 e pCambia1391z tenham sido idênticos o desenvolvimento e regeneração de brotos ocorreu de maneira diferente para o material transformado com as construções com pTF102 (Figura 21). Após o co-cultivo, os explantes de todas as construções foram transferidos para meio de regeneração (MS suplementado com 2 mg/L de BAP e 300 mg/L de cefotaxima). Porém, os antibióticos de seleção foram diferentes, sendo utilizados de acordo com o gene de resistência de cada vetor. Para pCambia1391z foi acrescido canamicina (50 mg/L) e para pTF102 foi espectinomicina (50 mg/L). A cefotaxima foi utilizada para evitar o desenvolvimento da *A. tumefaciens*.

Figura 21 - Etapas da cultura de tecidos envolvendo a transformação de *N. tabacum* com plasmídeos pTF102 recombinados.



Legenda: (A) Plântulas obtidas a partir de semente. (B) Planta com folhas maiores, apta para retirada dos discos foliares. (C) Explantes excisados em forma de discos foliares. (D) Co-cultivo em *A. tumefaciens* contendo os plasmídeos recombinantes. (E, F e G) Formação de calos a partir dos discos foliares em meio MS contendo o antibiótico de seleção (espectinomomicina 50 mg/L). (H) Calos não regenerados com necrose e oxidação. Fonte: Do autor (2018).

Os antibióticos podem apresentar tanto ação bacteriostática, e não bactericida, como também podem ser fitotóxicos e favorecer alterações nas respostas morfogênicas (PALÚ et al., 2011; SABALE et al., 2015; ABREU et al., 2016). Em alguns casos, a presença de antibióticos no meio de cultura pode comprometer ou afetar a diferenciação normal e o crescimento do tecido do explante (MENG et al., 2014).

Estudos dos efeitos de antibióticos em cotilédones de *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* cultivados *in vitro* também relacionam a inibição de brotações, alterações nos processos de organização e diferenciação celular e produção de brotos albinos de acordo com as diferentes concentrações de antibióticos utilizadas (MENG et al., 2014).

Os métodos de transformação genética de plantas estão associados a técnicas *in vitro* de cultura de tecidos, isto é, a regeneração de plantas inteiras com base em células transformadas. Em muitos casos, essa etapa é limitante na obtenção de plantas transgênicas em razão das dificuldades intrínsecas ao processo de regeneração (STUDART-GUIMARÃES et al., 2003).

Durante o período de cultivo *in vitro* houve perda de 100% das plantas transformadas com a construção pCambia1391z + pFull, decorrente do crescimento excessivo da *A. tumefaciens* no meio de cultura, impedindo o desenvolvimento da planta

obtida. Outro fator limitante no processo foi à aclimação, pois nesta fase de transição para a casa de vegetação algumas plantas foram atingidas por doenças e pragas, como por exemplo, cochonilha e mosca branca.

Após as etapas de cultivo *in vitro* foram obtidas plantas apenas com as construções com pCambia1391z, porém não foi possível obter plantas de pCambia1391z + pFull e os brotos com o plasmídeo recombinado pTF102 não regeneraram.

Dessa forma procedeu-se as etapas seguintes com 10 plantas cada:

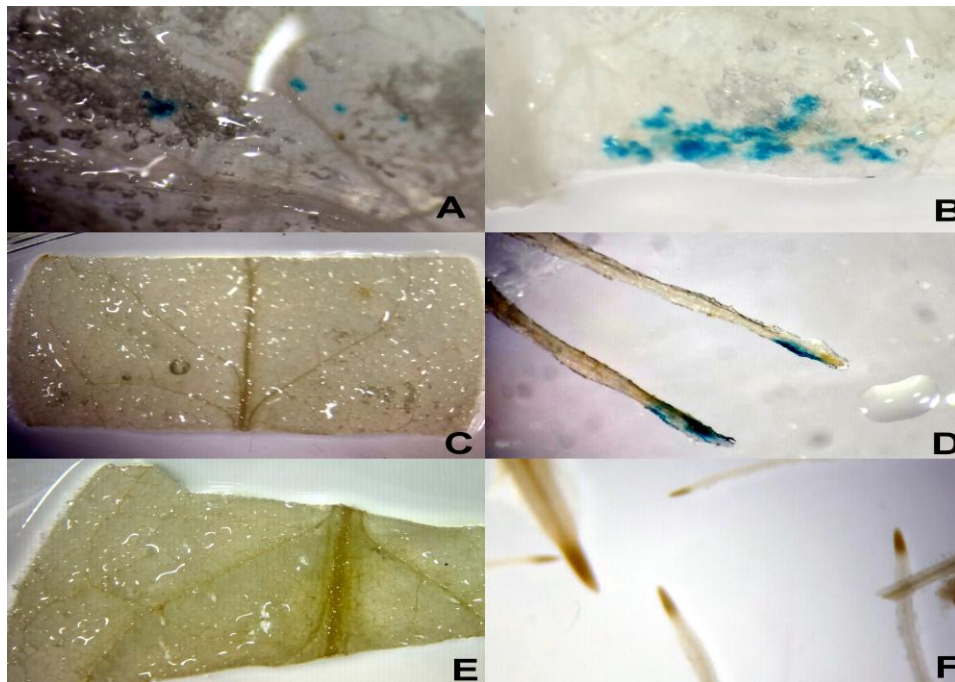
- 1 - Controle negativo (plantas obtidas pelo mesmo processo, porém sem co-cultivo em *A. tumefaciens*);
- 2 - Controle positivo 1 (pCambia1391z não modificado);
- 3 - pCambia1391z + pCore do Prom\_Musa\_Embrapa\_005;
- 4 - pCambia1391z + Foc1.

### **5.7 Ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática $\beta$ -glucuronidase (GUS) nas folhas e raízes das plantas transformadas**

Os ensaios histoquímicos para detecção da atividade enzimática  $\beta$ -glucuronidase (GUS) foram realizados em folhas e raízes de *N. tabacum* transformado, um evento por construção foi escolhido ao acaso. A coloração azul caracteriza a expressão do gene repórter (Figura 22). Nenhuma atividade GUS foi detectada em folhas ou raízes do controle negativo. O mesmo ocorreu para as amostras transformadas como a construção pCambia1391z + Foc1, o que pode ser explicado pelo fato da inserção de Foc1 ter ocorrido entre os sítios de restrição das enzimas *AvrII* + *PmlI*, situadas no meio do gene GUS, o que fez com que sua sequência fosse interrompida.



Figura 22 - Imagens dos ensaios histoquímicos para detecção da atividade enzimática  $\beta$ -glucuronidase (GUS) nas plantas transformadas de *N. tabacum*.



Legenda: (A e B) Folha de planta transformada com pCAMBIA1391z - controle positivo. (C e D) Folha e raiz de planta transformada com o plasmídeo recombinante contendo o promotor Prom\_Musa\_Embrapa\_005 (tecido-específico de raiz) na versão parcial – pCore. (E e F) Folha e raiz de planta transformada com o plasmídeo recombinante contendo o gene Foc1. Fonte: Do autor (2018).

Folhas do controle positivo (pCambia1391z) apresentaram atividade GUS, o mesmo não ocorreu para a raiz. Já para a construção pCambia1391z + Prom\_Musa\_Embrapa\_005 (pCore) não houve detecção de atividade GUS na folha, mas houve atividade na raiz, especialmente, na coifa. Esses resultados sugerem que o promotor tecido específico de *Musa* spp. em sua versão parcial é funcional e específico de raiz. Um estudo semelhante com o promotor de milho (ZmRCP-1), utilizado em *Musa* spp, também apresentou a expressão do gene repórter GUS na coifa da raiz, demonstrando potencial de uma expressão específica contribuindo para a biossegurança de bananeiras resistentes (ONYANGO et al., 2016).

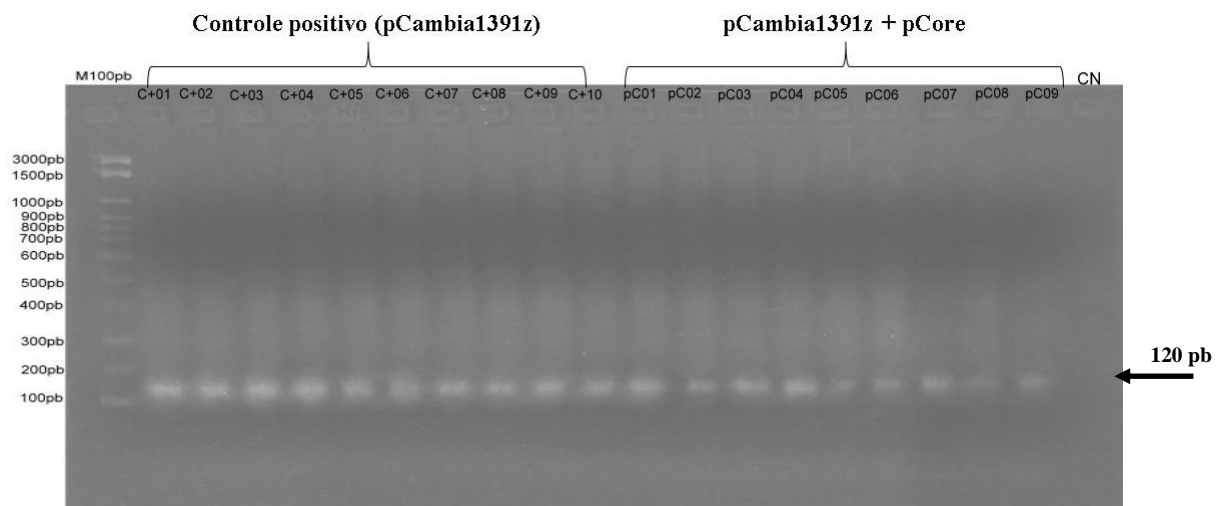
Em testes com os promotores At1g74770 e At2g18140 de genes NRRS (nematode-responsive and root-specific) Kakrana et al. (2017) observaram como resultado da análise histoquímica da atividade de GUS em plantas de *Arabidopsis* transformadas uma expressão altamente restrita em raízes, em resposta à infecção por nematóide. Estes resultados indicam que estes promotores são excelentes candidatos para desenvolver plantas resistentes com expressão direcionada para raiz.

Na análise dos resultados do teste para detecção da atividade enzimática  $\beta$ -glucuronidase (GUS) não foi possível atestar se o tamanho do promotor pode ou não influenciar na expressão do gene repórter GUS, devido à perda de 100% das plantas transformadas com a versão completa do promotor tecido-específico (pFull).

### 5.8 Análises moleculares das plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*

A caracterização molecular das plantas transgênicas regeneradas foi realizada por PCR convencional utilizando primers específicos (Apêndice A) para testar o DNA genômico extraído das plantas regeneradas. Os resultados das reações de PCR usando os pares de primers GUS-F/GUS-R mostraram a presença dos fragmentos de 120 pb tanto no DNA das plantas transformadas com o controle positivo (pCambia1391z) quanto nas transformadas com a construção pCambia1391z + pCore (Figura 23). Não houve amplificação nas reações de PCR com as plantas Controle negativo.

Figura 23 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com o controle positivo (pCambia1391z) e com pCambia1391z + pCore, utilizando o par de primers GUSF/GUSR.

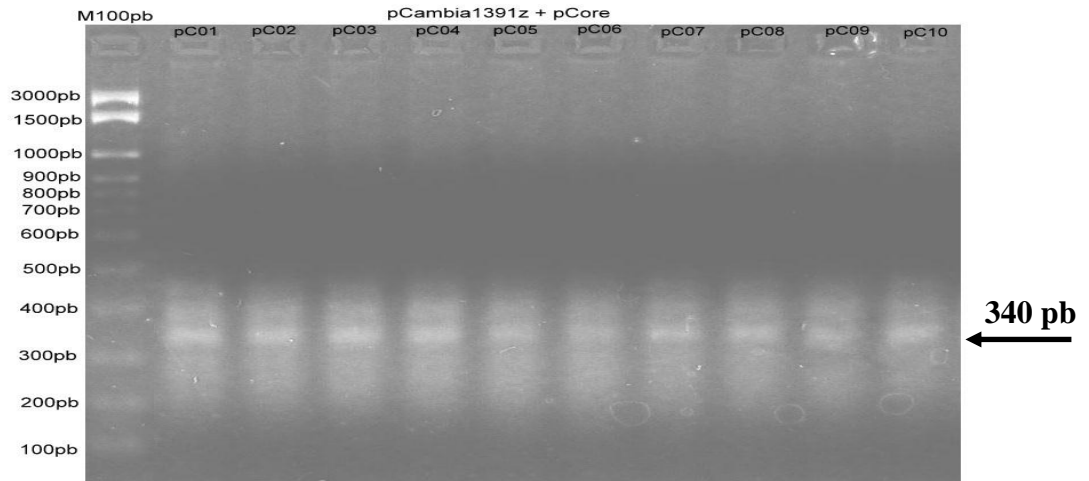


Fonte: Do autor (2018).

Os resultados das reações de PCR usando os pares de primers P28CO-Fw/ P28-Rv permitiram verificar a inserção de pCore nas plantas transformadas, pois o par de primers P28CO-Fw/ P28-Rv (340 pb) flanqueia os fragmentos da região promotora (Figura 24).



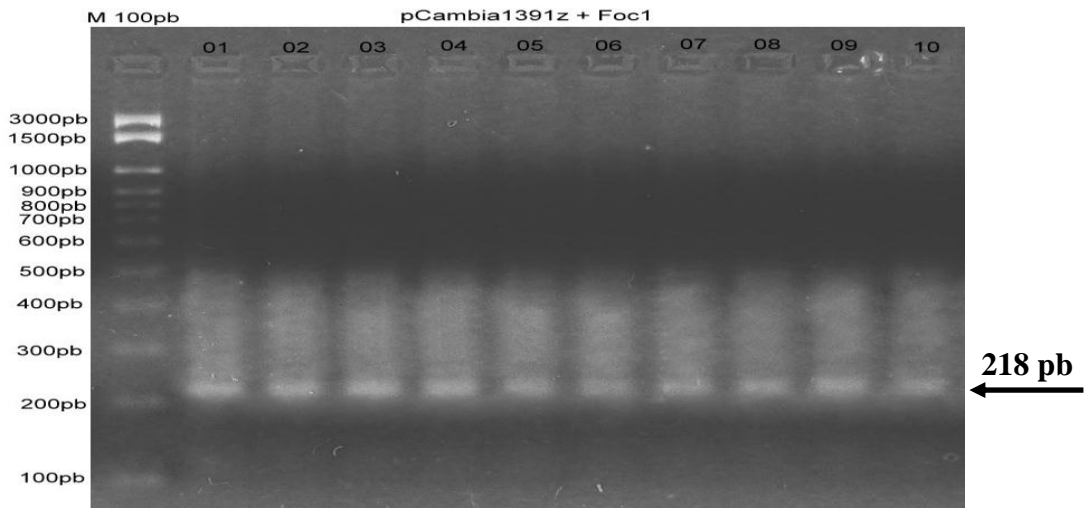
Figura 24 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com pCambia1391z + pCore, utilizando o par de primers P28CO-Fw/ P28-Rv.



Fonte: Do autor (2018).

Para confirmar a presença do gene *Foc1* nas plantas transformadas com o plasmídeo recombinante (pCambia1391z + *Foc1*) foi utilizado o par de primers internos FOC1-FI/FOC1-RI. O resultado das reações de PCR permitiu verificar a inserção do gene *Foc1* nas plantas analisadas. A análise do gel de agarose (Figura 25) possibilitou confirmar a amplificação do fragmento com o tamanho esperado de 218 pb.

Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose para análise dos fragmentos obtidos após a PCR convencional com o DNA de plantas transformadas com pCambia1391z + *Foc1*, utilizando o par de primers FOC1-FI/FOC1-RI.



Fonte: Do autor (2018).

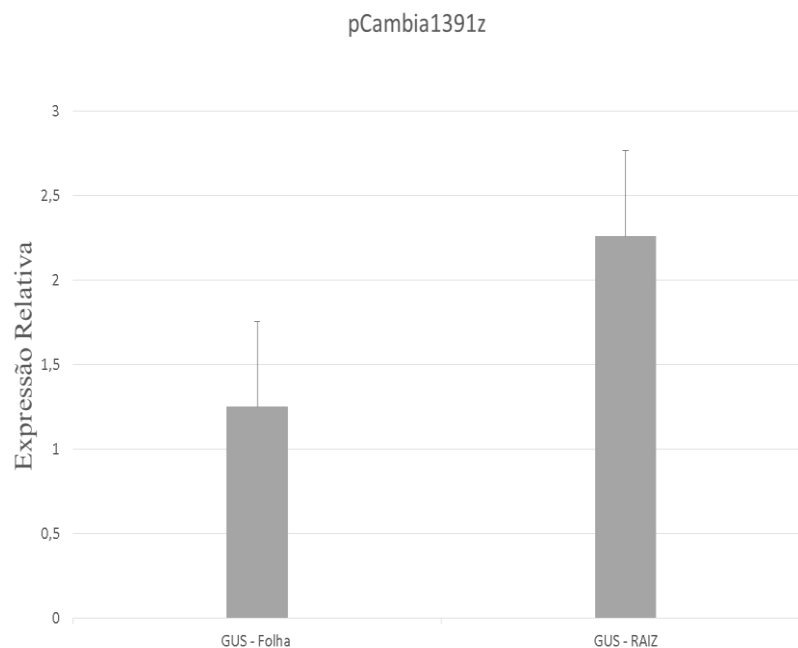
Após todas as verificações, plantas as quais não foram observados os amplicons específicos dos pares de primers GUSF/GUSR, P28CO-Fw/P28-Rv e FOC1-FI/FOC1-RI foram descartadas.

### 5.9 Ensaio de PCR em tempo real (qPCR)

Com base nos resultados do teste de diluição, os ensaios de qPCR foram realizados com todas as amostras de cDNA das plantas transformadas diluídas em água ultrapura estéril na concentração de 1/5. Para todas as análises o controle endógeno foi o gene da Actina (ActinF/ActinR) escolhido após os resultados dos testes de primers.

Por meio da análise de qPCR foi possível observar a expressão do gene *uidA* (GUS) tanto na amostra com cDNA de folha, quanto na amostra com cDNA de raiz (Figura 26) de *N. tabacum* transformada com o controle positivo (pCambia1391z), o que confirma a expressão constitutiva do gene repórter.

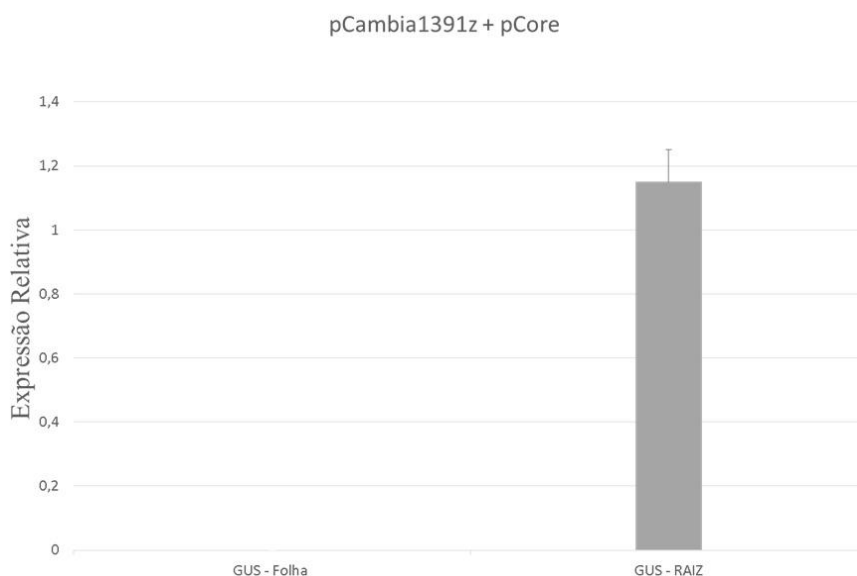
Figura 26 – Expressão do gene GUS analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas e raízes de *N. tabacum* transformado com o vetor pCambia1391z.



Fonte: Do autor (2018).

Para as plantas de *N. tabacum* transformadas com a construção pCambia + promotor tecido específico (pCore) não houve expressão do gene repórter GUS em folhas; Já em raiz foi possível observar a expressão do gene *uidA* (GUS) (Figura 27), o que confirma a expressão específica em raiz mediada pelo promotor pCore.

Figura 27 – Expressão do gene GUS analisada por PCR quantitativa em tempo real nas raízes de *N. tabacum* transformado com a construção pCambia1391z + pCore.



Fonte: Do autor (2018).

A necessidade de identificação de promotores responsivos específicos de tecidos tem sido cada vez mais enfatizada (KAKRANA et al., 2017). A raiz é o primeiro órgão da planta afetado por tensões como estresse iônico e osmótico decorrentes da seca, salinização do solo, acúmulo de metais pesados, deficiência de nutrientes e presença de microrganismos da rizosfera (JONES et al., 2008). Além disso, o sistema radicular captura água e nutrientes, importantes para o desenvolvimento e rendimento das culturas. Dessa forma, estudos de promotores específicos de raiz e promotores induzíveis de raiz tem sido foco biotecnológico, uma vez que a superexpressão de proteínas localizadas neste órgão seria capaz de melhorar o crescimento ou a tolerância ao estresse das plantas (GHANEM et al., 2010).

Sevin-Pujol et al. (2017) desenvolveram construções gênicas e transformaram *Medicago truncatula* para testar seis promotores com atividades específicas em diferentes camadas de células radiculares. Originários de *Arabidopsis*, *Lupinus* e *Solanum* eles previam ser especificamente ativos na epiderme da raiz (SIEXT1), córtex da raiz (AtCO2 e AtPEP), endoderme da raiz e periciclo (AtCASP1 e LaSCR1) e células companheiras do floema (AtSUC2). Com os resultados os autores verificaram que o promotor LaSCR1 apresentou maior especificidade para expressão na endoderme do que o promotor AtCASP1 que apresentou consistente atividade nas camadas de células corticais mais interiores de *M. truncatula*. Além disso, pAtCASP1 apresentou maior atividade nas células em frente aos pólos do xilema. No entanto, nenhum dos promotores que foram testados mostraram atividade tecidual totalmente

restrita à endoderme. O promotor AtPEP foi consistentemente ativo em todas as camadas de células corticais, e frequentemente na endoderme apresentando elevado nível de atividade ao longo da raiz primária.

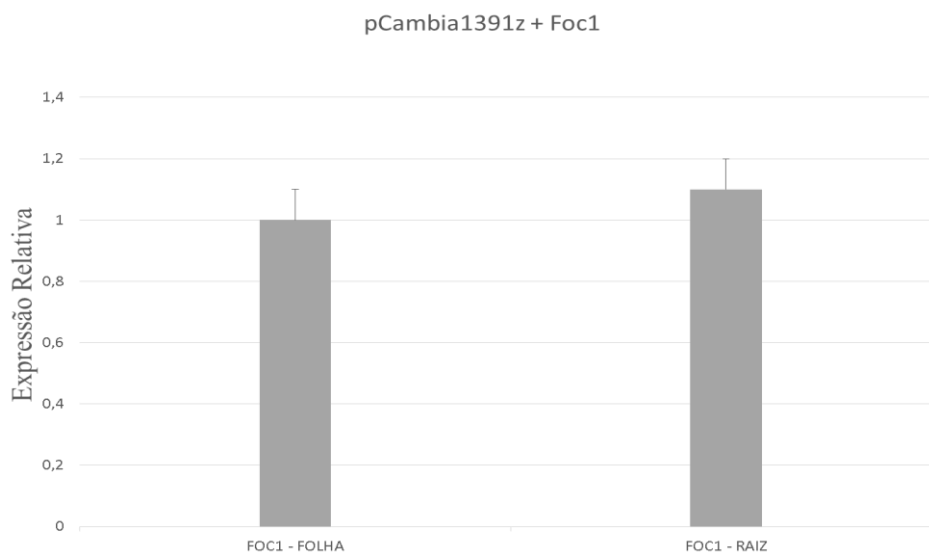
Li et al. (2013) isolaram e caracterizaram dois promotores específicos de raiz em arroz (*Oryza sativa* L.). Para tal, avaliaram os padrões de expressão dos genes Os03g01700 e Os02g37190 em plantas de arroz, bem como as atividades promotoras desses genes em arroz transgênico. A região promotora de dois genes (Os03g01700 e Os02g37190) foi ligada ao gene repórter *GUS* e plantas de arroz foram transformadas. Análises histoquímicas revelaram que os dois promotores foram ativos nas raízes primárias e secundárias ao longo dos estágios de desenvolvimento da planta, porém não se expressaram em pelos radiculares.

Grunenvaldt et al. (2015) analisando via RT-PCR o gene Eucgr.G02172 verificaram sua especificidade no tecido de raiz de *Eucalyptus grandis* quando comparado aos tecidos de folha e xilema da mesma espécie. No entanto, o resultado observado na análise histoquímica apresentou-se de maneira contrária. Diferente deste estudo que obteve resultados positivos de expressão do gene *GUS* regulado pelo promotor tecido específico de raiz tanto nas análises histoquímicas quanto nas análises via RT-PC, apresentou amplo potencial de utilização, com alta atividade e capacidade de induzir expressão localizada nos tecidos da raiz. Apresenta propriedades ideais para aplicações que requerem especificidade na expressão de genes, podendo ser utilizado para dirigir a expressão específica em raízes de plantas transgênicas de *Musa* spp. e outras culturas de interesse, no que diz respeito à melhoria de absorção de água e nutrientes, crescimento de raízes, tolerância à seca e resistência a vários patógenos.

Não foi possível confirmar se o tamanho do promotor pode ou não influenciar na expressão relativa do gene *GUS*, pois houve perda total das plantas transformadas com a versão completa (pFull) do promotor Prom\_Musa\_Embrapa\_005, algumas não se desenvolveram *in vitro* em decorrência do crescimento excessivo da *Agrobacterium* e outras ao iniciar o processo de aclimatação foram atingidas por pragas e doenças.

Com base nos resultados da análise de qPCR foi possível observar que houve expressão do gene *Foc1* nas folhas e raízes das plantas transformadas com a construção pCambia1391z + *Foc1* (Figura 28).

Figura 28 – Expressão do gene Foc1 analisada por PCR quantitativa em tempo real nas folhas e raízes de *N. tabacum* transformado com a construção pCambia1391z + Foc1.



Fonte: Do autor (2018).

Em estudos anteriores foram identificados genes de defesa *up regulated* (Proteínas PRs) na cultivar de banana ‘BRS PLATINA’, que podem estar envolvidas com a resistência a fusariose. Essas proteínas correspondem a genes citoplasmáticos de resistência, com domínios NB-LRR e de membrana, receptor tipo kinase (COSTA, 2013). Proteínas quinases exercem um papel importante na sinalização durante o reconhecimento e subsequente ativação/regulação dos mecanismos de defesa da planta (DING et al., 2008). A cultivar resistente apresenta um padrão de expressão altamente induzido para os receptores ricos em leucina presente na membrana plasmática. Os receptores quinase ricos em repetições de leucina estão envolvidos em várias funções biológicas incluindo percepção hormonal, crescimento, desenvolvimento e interação planta-patógeno (HAFFANI et al., 2004). Segundo Ding et al. (2015), as quinases estão associadas com o regulamento das características fisiológicas e virulência em *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Na análise da expressão do gene Foc1 por qPCR foi possível observar a expressão constitutiva do gene de resistência, que já era esperada, pois Foc1 estava sob regulação do promotor 35S de CaMV (constitutivo). A partir da análise do resultado da qPCR com este gene é possível confirmar que as plantas foram efetivamente transformadas. O uso de plantas resistentes a doenças é uma abordagem altamente eficaz, que tem sido extensivamente empregada há décadas para produzir novas variedades resistentes a doenças, seja através de programas de

melhoramento convencionais ou, mais recentemente, da engenharia genética (NEJAT et al., 2016). Dessa forma, estudos como este pode contribuir no desenvolvimento de estratégias e técnicas para aliviar as perdas de plantas cultivadas por doenças.

Este estudo subsidiará o preparo de novas construções com promotores tecido-específicos regulando a expressão do gene Foc1. Serão necessários novos trabalhos para verificar a funcionalidade deste gene, através da inoculação do fungo *F. oxysporum* f. sp. *cubense* em plantas transformadas.

## 6. CONCLUSÕES

As duas versões da região promotora (Prom\_Musa\_Embrapa\_005) de caráter tecido-específico, *full-promoter* (completo) e *core promoter* (parcial) foram isoladas e clonadas. A confirmação foi possível através da análise dos fragmentos obtidos mediante PCR convencional.

Os dois genes candidatos, Foc1 e Foc2, potencialmente envolvidos na resistência a fusariose, também foram isolados e clonados. A análise dos géis de agarose possibilitou confirmar a amplificação dos fragmentos com os tamanhos esperados.

Foi possível realizar a montagem de seis cassetes gênicos: pCambia1391z + Prom\_Musa\_Embrapa\_005 (pFull); pCambia1391z + Prom\_Musa\_Embrapa\_005 (pCore); pCambia1391z + Foc1; pCambia1391z + Foc2; pTF102 + Foc1 e pTF102 + Foc2. Porém, não houve confirmação das duas construções com Foc2.

Plantas de *N. tabacum* foram estabelecidas *in vitro* para a etapa de transformação genética com as quatro construções confirmadas e mais um controle positivo de cada vetor (pCambia1391z e pTF102).

Na análise da expressão do gene repórter *GUS* sob a regulação do promotor tecido-específico pCore foi possível confirmar sua direcionalidade para raiz, pois no ensaio histoquímico para detecção da atividade enzimática  $\beta$ -glucuronidase (*GUS*) realizado em folha e raiz de *N. tabacum* transformado não houve detecção de atividade *GUS* na folha, mas apresentou atividade na raiz, especialmente, na coifa, demonstrando potencial para fornecer uma expressão focalizada. Isso contribui para práticas de cisgenia e, conseqüentemente, uma melhor aceitação comercial da engenharia genética, diminuindo questionamentos de biossegurança, além de prevenir a expressão gênica generalizada e contínua na planta.

Na análise da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real – qPCR foi possível verificar a expressão específica do gene *GUS* em raiz de plantas transformadas com o promotor Prom\_Musa\_Embrapa\_005 na versão pCore e a expressão constitutiva do controle positivo assim como do gene de resistência candidato de *Musa* spp (Foc1).

## REFERÊNCIAS

- AKEHURST, B C. **Tobacco**. 2<sup>a</sup> ed. Tropical Agricultural Series, 164. New York: Longman Inc. 1981.
- ABREU, E.; CASTILLO, M. S. D.; SOL, G. A. D.; GONZÁLEZ, G. Efecto de antibióticos en la propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem. **Plant Biotechnology**, [SI], v. 16, n. 1, jan. 2016. ISSN 2074-8647.
- ANGELIN-BONNET, O.; BIGGS, P. J.; VIGNES, M. Gene regulatory networks: a primer in biological processes and statistical modelling. **q-bio.QM**. 2018.
- AQUINO, S. O.; CARNEIRO, F. A.; RÊGO, E. C. S; ALVES, G. S. C.; ANDRADE, A. C.; MARRACCINI, P. Functional analysis of different promoter haplotypes of the coffee (*Coffea canephora*) CcDREB1D gene through genetic transformation of *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 132, n. 2, p. 279-294, 2017.
- ARAGÃO, F.; SANTOS, M. D. O.; MORAIS, L.; ROMANO E. Metodologias para transformação genética de plantas-modelo. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica**, 2002.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 379-406, 2009.
- BRASILEIRO, A C. M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A C. M.; CARNEIRO, V. T. de C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Embrapa Cenargen, 1998. 309 p.
- BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: the natural system of plants genes transference. **Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento (Brasil)**, 2000.
- BROWN, J. K. M. Durable resistance of crops to disease: A darwinian perspective. **Annu. Rev. Phytopathol.** 53(1):513–539. 2015.
- BUTLER, D. Fungus threatens top banana. **Nature** 504, 195 e196. 2013.
- CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Maize Transformation to Obtain Plants Tolerant to Viruses by RNAi Technology. **INTECH Open Access Publisher**, 2011.
- COSTA, Juliana Leles. **Estudos histológicos e moleculares da interação *Musa spp.* x *Fusarium oxysporum f. sp. cubense***. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Mal-do-Panamá: Fim do Bananal? **Cultivar Hortaliças e Frutas**, v. 3, n. 18, p. 27-29, 2003.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Doenças da Bananeira. In: Freire, F.C.O., Cardoso, J.E. e Viana, F.M.P (eds.) Doenças de Fruteiras Tropicais de Interesse Agroindustrial. **Embrapa Informações Tecnológica**, Brasília, DF, 687p, 2003.



CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. Doenças da bananeira (*Musa* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 99-117.

CZISLOWSKI, E.; FRASER-SMITH, S.; ZANDER, M.; O'NEILL, W. T.; MELDRUM; R. A.; TRAN-NGUYEN, L. T.; BATLEY, J.; AITKEN, E. A. B. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer. **Molecular plant pathology**, 2017.

DANINO, Y. M.; EVEN, D.; IDESES, D.; JUVEN-GERSHON, T. The core promoter: at the heart of gene expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 8, p. 1116-1131, 2015.

DING, X.; RICHTER, T.; CHEN, M.; FUJII, H.; SEO, Y. S.; XIE, M.; ZHENG, X.; KANRAR, S.; STEVENSON, R. A.; DARDICK, C.; LI, Y.; JIANG, H.; ZHANG, Y.; YU, F.; BARTLEY, L. E.; CHERN, M.; BART, R.; CHEN, X.; ZHU, L.; FARMERIE, W. G.; GRIBSKOV, M.; ZHU, J. K.; FROMM, M. E.; RONALD, P. C.; SONG, W. Y. A rice kinase-protein interaction map. **Plant physiology**, v. 149, n. 3, p. 1478-1492, 2009.

DING, Z.; LI, M.; SUN, F.; XI, P.; SUN, L.; ZHANG, L.; JIANG, Z. Mitogen-activated protein kinases are associated with the regulation of physiological traits and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **PLoS ONE** 10 (4): e0122634. doi: 10.1371 / journal.pone.0122634. 2015.

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

ESPINOZA, C.; SCHLECHTER, R.; HERRERA, D.; TORRES, E.; SERRANO, A.; MEDINA, C.; ARCE-JOHNSON, P. Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. **Biological Research**, London, v. 46, n. 4, p. 323-331, 2013.

FALEIRO, F.G.; RAGAGNIN, V.A.; SCHUSTER, I., CORRÊA, R.X.; GOOD-GOD, P.I.; BROMMONSHENKEL, S.H.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro à ferrugem, antracnose e mancha-angular usando marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira** 28:059-066. 2003.

FLOR, H.H. Host-parasite interactions in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathology** 45:680-685. 1955.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual review of phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275-296, 1971.

GAO, J.; WANG, G.; MA, S.; XIE, X.; WU, X.; ZHANG, X.; WU, Y.; ZHAO, P.; XIA, Q. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. **Plant molecular biology**, v. 87, n. 1-2, p. 99-110, 2015.

GAWEHNS, F.; HOUTERMAN, P. M.; AIT ICHOU, F.; MICHELSE, C. B.; HIJDR, M.; CORNELISSEN, B.J.C.; REP, M.; TAKKEN, F. L. W. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death. **Mol. Plant Microbe In.** 27, 336–348. 2014.

GHAG, SIDDHESH B.; SHEKHAWAT, UPENDRA K. SINGH; GANAPATHI, THUMBALLI, R. R. Native cell-death genes as candidates for developing wilt resistance in transgenic banana plants. **AOB plantas**, v. 6, p. plu037 de 2014.

GHANEM, M. E.; HICHRI, I.; SMIGOCKI, A. C.; ALBACETE, A.; FAUCONNIER, M. L.; DIATLOFF, E.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Root-targeted biotechnology to mediate hormonal signalling and improve crop stress tolerance. **Plant Cell Reports**. v. 30, n. 5, p. 807-823, 2011.

GROENEWALD, S.; VAN DEN BERG N.; MARASAS W. F. O.; VILJOEN A. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Mycological Research**, v.110, p. 297-305, 2006.

GRUNENVALDT, R. L.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; GERHARDT, I. R.; QUOIRIN, M. G. G. Promoters Used in Genetic Transformation of Plants. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 1-9, 2015.

GUO, L; HAN L, YANG L, ZENG H, FAN D, ZHU Y. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95543, 2014.

HAFFANI, Y. Z.; SILVA, N. F.; GORING, D. R. Receptor kinase signalling in plants. **Canadian journal of botany**, v. 82, n. 1, p. 1-15, 2004.

HAMMOND-KOSAC, K.E.; JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Eds.). Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, Maryland: **APS Press**. p.1102-56, 2000.

HAN, Q.; CHEN, R.; YANG, Y.; CUI, X.; GE, F.; CHEN, C.; LIU, D. A glutathione S-transferase gene from *Lilium regale* Wilson confers transgenic tobacco resistance to *Fusarium oxysporum*. **Scientia Horticulturae**, v. 198, p. 370-378, 2016.

HERRERA-ESTRELLA, L.; BLOCK, M.; MESSENS, E.; HERNALSTEENS, J. P.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. **EMBO J.** 2: 987-995, 1983.

HOLME, I.B.; WENDT, T.; HOLM, P.B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 395-407, 2013.

JONES, J. D.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, London, v. 444, p. 323-329, 2006.

JONES M. O.; MANNING, K.; ANDREWS J.; WRIGHT, C. L.; TAYLOR, I. B.; THOMPSON, A. J. The promoter from SIREO, a highly-expressed, root-specific *Solanum*

*lycopersicum* gene, directs expression to cortex of mature roots. **Functional Plant Biology**. v.35, p.1224-1233, 2008.

KAKRANA, A.; KUMAR, A.; SATHEESH, V.; ABDIN, M. Z.; SUBRAMANIAM, K.; BHATTACHARYA, R. C.; SRINIVASAN, R.; SIROHI, A.; JAIN, P. K. Identification, Validation and Utilization of Novel Nematode-Responsive Root-Specific Promoters in Arabidopsis for Inducing Host-Delivered RNAi Mediated Root-Knot Nematode Resistance. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 2049, 2017.

KUMARI, M., RAI, A. K.; DEVANNA, B. N.; SINGH, P. K.; KAPOOR, R.; RAJASHEKARA, H.; PRAKASH, G.; SHARMA, V.; SHARMA, T. R. Co-transformation mediated stacking of blast resistance genes Pi54 and Pi54rh in rice provides broad spectrum resistance against *Magnaporthe oryzae*. **Plant Cell Rep.** 36: 1747. 2017.

LAMONDIA, J. A. **Scantic, a new Fusarium-wilt resistant broadleaf tobacco cultivar**. Connecticut Agricultural Experiment Station, 2001.

LI C.; SHAO J.; WANG Y.; LI W.; GUO D.; YAN B.; XIA Y.; PENG M. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **BMC Genomics** 14:851. 2013.

LI, Y.; LIU, S.; YU, Z.; LIU, Y.; WU, P. Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**. v. 207, p. 37-44, 2013.

LIU, J.; GAO, P.; SUN, X.; ZHANG, J.; SUN, P.; WANG, J.; JIA, C; ZHANG, J; HU, W; XU, B; JIN, Z. Efficient regeneration and genetic transformation platform applicable to five Musa varieties. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 33-38, 2017.

LIU, W.; MAZAREI, M.; YE, R.; PENG, Y.; SHAO, Y.; BAXTER, H. L.; ROBERT W. SYKES, GEOFFREY B. TURNER, MARK F. DAVIS, ZENG-YU WANG, RICHARD A. DIXON AND C. NEAL STEWARTJR. Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) promoters for green tissue-specific expression of the MYB4 transcription factor for reduced-recalcitrance transgenic switchgrass. **Biotechnology for Biofuels**. 11:122. 2018

MA, L.; CORNELISSEN, B. J.; TAKKEN, F. L. A nuclear localization for Avr2 from *Fusarium oxysporum* is required to activate the tomato resistance protein I-2. **Front. Plant Sci.** 4, 94, 2013 doi: 10.3389/fpls.2013.00094.

MA, L.; HOUTERMAN, P. M.; GAWEHNS, F.; CAO, L.; SILLO, F.; RICHTER, H.; CLAVIJO-ORTIZ, M. J.; SCHMIDT, S. M.; BOEREN, S., VERVOORT, J.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M.; TAKKEN, F. L. The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. **New Phytol.** 208, 507–518. 2015

MENG, Q.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LIU, C.; REN, F.; FENG, H. Effects of antibiotics on *in vitro*-cultured cotyledons. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 50: 436. 2014.

MERCX, S.; TOLLET, J.; MAGY, B.; NAVARRE, C.; BOUTRY, M; Gene Inactivation by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 SuspensionCells. **Frontiers in plant science** , v. 7, 2016.

MOMMA, N.; MOMMA, M.; KOBARA, Y. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms. **J. Gen. Plant Pathol.** 76 (5), 336–344. 2010.

MOURÃO FILHO, F.A.A.; STIPP, L.C.; MENDES, B.M.J. Perspectivas da produção e utilização e transgênicos para o controle do huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 91-100, 2010.

MOSTERT, D.; MOLINA, A. B.; DANIELLS, J.; FOURIE, G.; HERMANTO, C.; CHAO, C. P.; FABREGAR, E.; SINOHIN, V. G.; MASDEK, N.; THANGAVELU, R.; LI, C.; YI, G.; MOSTERT, L.; VILJOEN, A. The distribution and host range of the banana *Fusarium* wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0181630, 2017.

MUNDT, C. C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. **Infect. Genet. Evol.** 27:446–455. 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEJAT, N.; ROOKES, J.; MANTRI, N. L.; CAHILL, D. M. Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 229-237, 2017.

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University Press, University Park, PA. 193p. 1983.

NTUI, V. O.; AZADI, P.; THIRUKKUMARAN, G.; KHAN, R. S.; CHIN, D. P.; NAKAMURA, I.; MII, M. Increased resistance to fusarium wilt in transgenic tobacco lines co-expressing chitinase and wasabi defensin genes. **Plant pathology**, v. 60, n. 2, p. 221-231, 2011.

ONYANGO, S. O.; RODERICK, H.; TRIPATHI, J. N.; COLLINS, R.; ATKINSON, H. J.; ODUOR, R. O.; TRIPATHI, L. The ZmRCP-1 promoter of maize provides root tip specific expression of transgenes in plantain. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 23, n. 1, p. 1, 2016.

PALÚ, E. G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A. N.; BOLIANI, A. C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 587-592. 2011.

PERAZA-ECHEVERRIA, S.; DALE, J. L.; HARDING, R. M.; SMITH, M. K.; COLLET, C. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. **Molecular Breeding**, Dodrecht, v. 22, p. 565-579, 2008.

PILET-NAYEL, M. L.; MOURY, B.; CAFFIER, V.; MONTARRY, J.; KERLAN, M. C.; FOURNET, S.; DUREL, C. E.; DELOURME, R. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. **Front. Plant Sci.**;8:1838. 2017.

PLOETZ, R. C. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. **Crop Protection**, v. 73, p. 7-15, 2015.

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, n. 1, p. 1-22, 2004.

QUIRINO, B. F.; BENT, A. F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 517-530, 2003.

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, N.S. Recent advances in genetic engineering for improvement of fruit crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 116, n. 1, p. 1-15, 2014.

RIMBAUD, L.; PAPAÏX, J.; REY, J-F.; BARRETT, L. G; THRALL, P. H. Assessing the durability and efficiency of landscape-based strategies to deploy plant resistance to pathogens. **PLoS Comput Biol** 14(4): e1006067. 2018.

ROCHA, D. F. O.; CUNHA, C. M. S; BELAZ, K. R. A.; SANTOS, F. N.; HINZ, R. H.; PEREIRA, A.; WICKET, E.; ANDRADE, L. M.; NASCIMENTO, C. A. O.; VISCONTI, A.; EBERLIN, M. N. Lipid and protein fingerprinting for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strain-level classification. **Anal Bioanal Chem**. 409:6803. 2017.

ROY, A. L.; SINGER, D. S. Core promoters in transcription: old problem, new insights. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 3, p. 165-171, 2015.

RUSTAGI, A.; JAIN, S.; KUMAR, D.; SHEKHAR, S.; JAIN, M.; BHAT, V.; SARIN, N. B. High efficiency transformation of banana [*Musa acuminata* L. cv. Matti (AA)] for enhanced tolerance to salt and drought stress through overexpression of a peanut salinity-induced pathogenesis-related class 10 protein. **Molecular biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 27-35, 2015.

SABALE, S. N.; PATIL D. M.; GOKHALE, N. B.; SAWARDEKAR, S. V.; SAWANT, S. S. Elimination of bacterial contamination by using antibiotics in micropropagation of banana (*Musa* spp.) cv. Grand naine **Journal of Cell and Tissue Research** 15(2): 5111-5115. 2015.

SANTOS, R. B.; VIANA, V. F.; TREVISOLI, S. H. V.; LEITE, D. C.; DI MAURO, A. O. Otimização de protocolo de transformação genética via biobalística. **Ciência e Tecnologia: FATEC – JB**, Jaboticabal, v. 3. 2011.

SCHERF, M.; KLINGENHOFF, A.; WERNER, T. Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by Promoter Inspector: a novel context analysis approach. **J. Mol. Biol.**, 297, 599–606, 2000.

SCHINOR, E. H., PAOLI, L. D., AZEVEDO, F. D., MOURÃO FILHO, F. D. A., & MENDES, B. M. J. Organogênese *in vitro* a partir de diferentes regiões do epicótilo de *Citrus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 28, n. 3, p. 463-466, 2006.

SEVIN-PUJOL, A.; SICARD, M.; ROSENBERG, C.; AURIAC, M-C.; LEPAGE, A.; NIEBEL, A.; GOUGH, C.; BENSMIHEN, S. Development of a GAL4-VP16/UAS trans-activation system for tissue specific expression in *Medicago truncatula*. **PLoS ONE** 12(11): e0188923. 2017.

SHAHMURADOV, I. A.; SOLOVYEV, V. V.; GAMMERMAN, A. J. Plant promoter prediction with confidence estimation. **Nucleic Acids Research**, vol. 33, n.3 1069–1076, 2005.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 845-881, 2002.

SILVA, P. R., DE JESUS, O. N., BRAGANÇA, C. A. D., HADDAD, F., AMORIM, E. P., & FERREIRA, C. F.. Development of a thematic collection of *Musa* spp. accessions using SCAR markers for preventive breeding against *Fusarium oxysporum* f. sp *cabense* tropical race 4. **Genet. Mol. Res**, 15, 15017765, 2016.

SMALE, S. T.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter. **Annu Rev Biochem.** 72, 449-479, 2003.

SMALE, S. T. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. **Genes Dev.**, 15, 2503–2508, 2001.

SMITH, M.; HAMILL, S.; LANGDON, P.; GILES, J.; DOOGAN, V.; PEGG, K. Towards the development of a Cavendish banana resistant to race 4 of fusarium wilt: gamma irradiation of micropropagated Dwarf Parfitt (*Musa* spp., AAA group, Cavendish subgroup). **Australian Journal of Experimental Agriculture** 46, 107e113. 2006.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics, and pathogenicity in *Hypomyces solani*. *Phytopathology*, v.44, p.338-342, 1953.

STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G. JONES, J.D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science** 268:661-667. 1995.

STEPHEN, T. S.; JAMES T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annual review of biochemistry**. v.72, p.449–479, 2003.

STUDART-GUIMARÃES, C.; LACORTE, C.; BRASILEIRO, M., A. C. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 167-178. 2003.

THATCHER, L. F.; GARDINER, D. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on *Arabidopsis*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 25, 180-190. 2012.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; WIDHOLZER, C. F.; ROMANO, E.; PETERS, J. A. Efficient expression of beta-glucuronidase reporter gene in vascular tissue of potato (*Solanum tuberosum* L.) utilizing a specific promoter (BRA3) from *Agrobacterium rhizogenes*. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 177-180, 2003.

TYAGI, A. K. Plant genes and their expression. **Current Science-Bangalore-**, v. 80, n. 2, p. 161-169, 2001.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 3, p. 121-129, 2002.

VAN DER PLANK, J.E. **Principies of plant infection**. New York: Academic, 1975. 216 p.

VAN DER PLANK, J.E. **Host pathogen interaction in plant disease**. New York: Academic, 1982.

VENTURA, J. A.; HINZ, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: Zambolim, L. et al. **Controle de doenças de plantas –FRUTEIRAS**. Suprema Gráfica e Editora Ltda. Viçosa, Minas Gerais, v. 2, p. 839-937, 2002.

VO NGOC, L.; WANG, Y. L.; KASSAVETIS, G. A.; KADONAGA, J. T. The punctilious RNA polymerase II core promoter. **Genes & development**, v. 31, n. 13, p. 1289-1301, 2017.

WANG, B.; LI, R.; RUAN, Y.; OU, Y.; ZHAO, Y.; SHEN, Q. Pineapple–banana rotation reduced the amount of *Fusarium oxysporum* more than maize–banana rotation mainly through modulating fungal communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 86, p. 77-86, 2015.

WEN, T.; HUANG, X.; ZHANG, J.; ZHU, T.; MENG, L.; CAI, Z. Effects of water regime, crop residues, and application rates on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 31, p. 30-37, 2015.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. S. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO J.** 2: 2143-2150, 1983.

## APÊNDICE

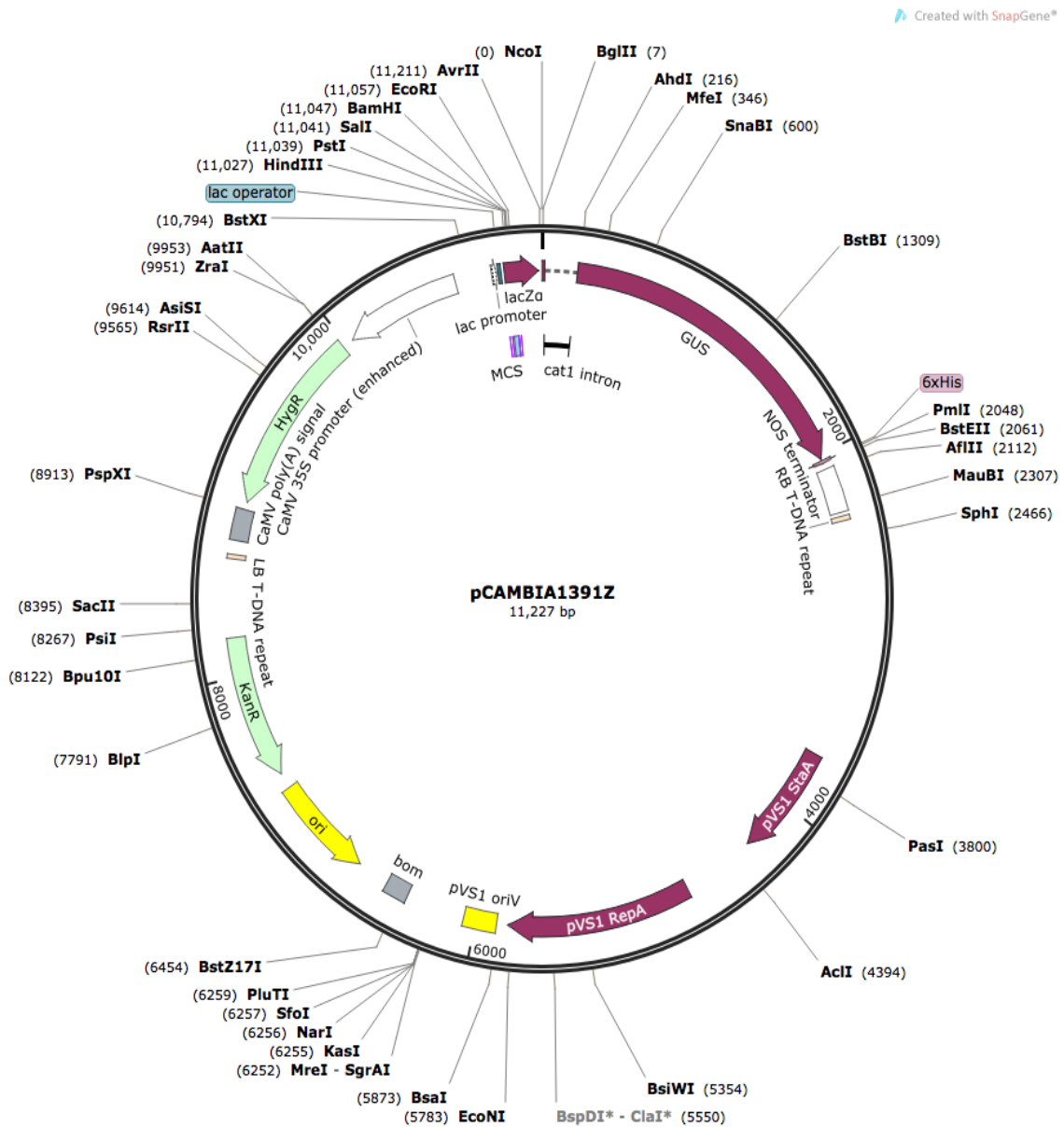
### APÊNDICE A – Relação de sequências dos pares de primers usados nas reações de PCR e qPCR

Tabela 1 – Sequências dos pares de primers usados nas reações de PCR (convencional e quantitativa - qPCR).

Nome	Sequência
GUS F	GCACTAGCGGGACTTTGCAA
GUS R	CGCGAAGCGGGTAGATATCA
P28FU-Fw/ <i>AvrII</i>	Sigilo
P28CO- Fw/ <i>AvrII</i>	Sigilo
P28-Rv/ <i>BglIII</i>	Sigilo
FOC1FC+ <i>SspI</i>	Sigilo
FOC1RC+ <i>SspI</i>	Sigilo
FOC1FC+ <i>AvrII</i>	Sigilo
FOC1RC+ <i>PmlI</i>	Sigilo
FOC2FC+ <i>SspI</i>	Sigilo
FOC2RC+ <i>SspI</i>	Sigilo
FOC2FC+ <i>AvrII</i>	Sigilo
FOC2RC+ <i>PmlI</i>	Sigilo
P28INT-FU	Sigilo
P28INT-FC	Sigilo
P28INT-Rv	Sigilo
FOC1-FI	Sigilo
FOC1-RI	Sigilo
Actin F	CCCAAGGCAAACCGAGAGAAG
Actin R	GTGGCTCACACCATCACCAG



**ANEXO A:** Figura representativa do vetor binário pCambia1391z demonstrando a localização dos sítios de corte das enzimas de restrição.



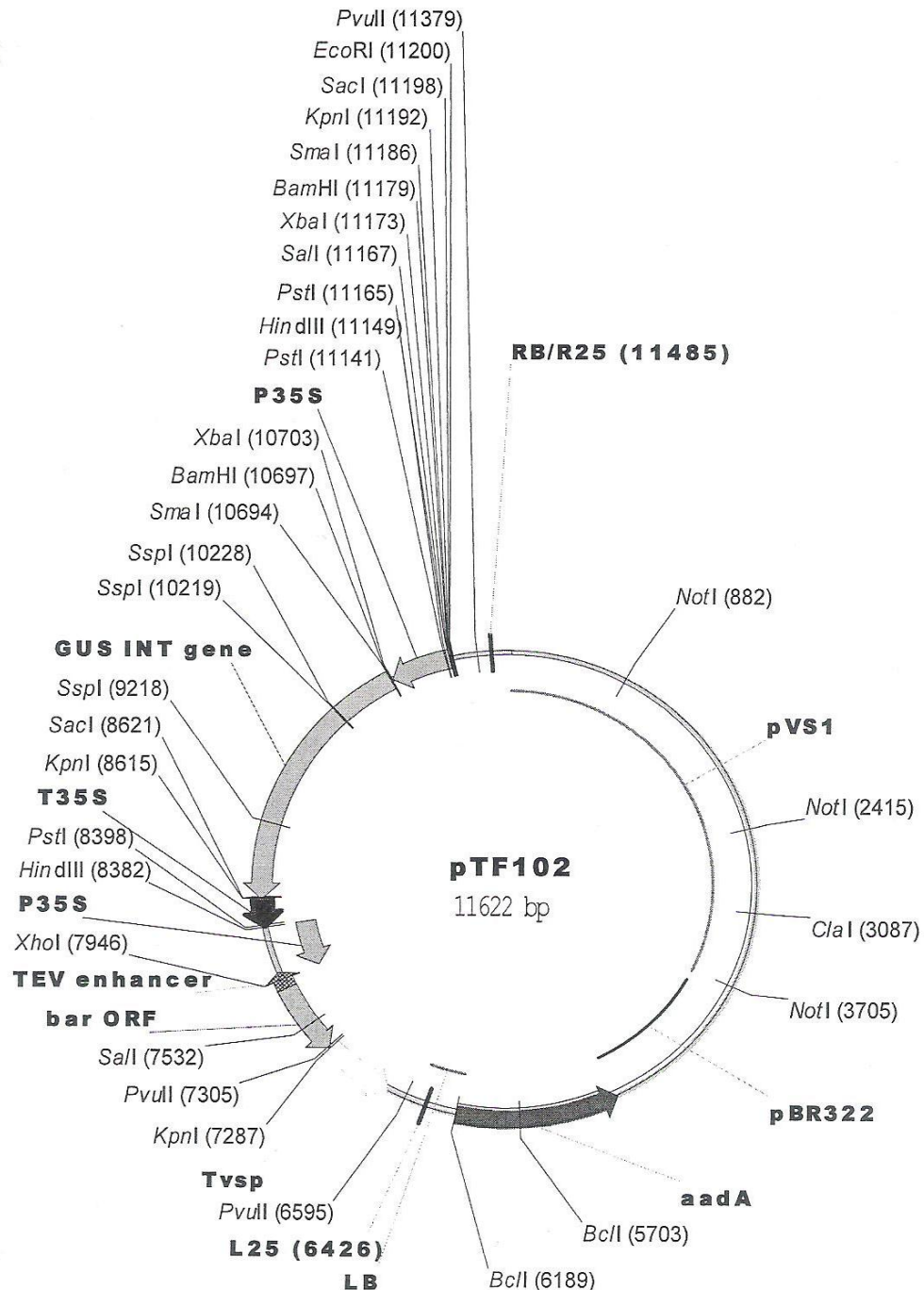
Fonte: SNAPGENE.

**ANEXO B:** Figura representativa do vetor binário pTF102 demonstrando a localização dos sítios de corte das enzimas de restrição.

Attachment 1

pTF102

2/26/2005



This construct is published in:

Frame, B.R., Shou, H., Chikwamba, R., Zhang, Z., Xiang, C, Fonger, T., Pegg, S-E., Li, B., Nettleton, D., Pei, P., Wang, K.. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a simple binary vector system. *Plant Physiology*, 129:13-22 (2002).

### DNA sequence components for construct pTF102

- aadA:** Aminoglycoside 3'-adenylyltransferase gene of *Shigella flexneris* 2a that confers resistant to antibiotic streptomycin (Chinault et al, 1986)
- bar:** Phosphinothricin acetyl transferase gene from *Streptomyces hygroscopicus* that confers resistant to herbicide phosphinothricin and its derivatives (Thompson et al, 1987; White et al, 1990; Becker et al, 1992)
- gus-int:** The  $\beta$ -glucuronidase gene containing a portable intron (Jefferson et al, 1987; Vancanneyt et al, 1990)
- P35S:** The cauliflower mosaic virus 35S promoter (Odell et al, 1985; Haq et al, 1995)
- Tnos:** 3' terminator from nopaline synthase gene of *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al, 1982)
- Tvsp:** 3' terminator from soybean vegetative storage protein gene (Mason et al, 1993; Haq et al, 1995)
- T35S:** 3' terminator from 35S transcripts of cauliflower mosaic virus (Condit and Meagher, 1983)
- TEV:** Tobacco Etch Virus translational enhancer (Gallie et al, 1995; Wilson, 1999).
- RB:** The T-DNA right border fragment from nopaline strain of *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski et al, 1982)
- LB:** The T-DNA left border fragment from nopaline strain of *Agrobacterium tumefaciens* (Zambryski et al, 1982)
- pVS1:** A broad host range plasmid from *Pseudomonas* (Itoh and Haas, 1985; Hajdukiewicz et al, 1994)

#### References

- Becker, D, Kemper, E, Schell, J, Masterson, R (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197.
- Chinault, AC, Blakesley, VA, Roessler, E, Willis, DG, Smith, CA, Cook, RG, Fenwick, RG (1986) Characterization of transferable plasmids from *Shigella flexneris* 2a that confer resistance to trimethoprim, streptomycin, and sulfonamides. *Plasmid* 15: 119-131.
- Condit C, Meagher RB (1983) Multiple, discrete 35S transcripts of cauliflower mosaic virus. *J Mol Appl Genet* 2:301-314
- Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*1: 561-573.
- Gallie, DR, Tanguay, RL, Leathers, V (1995) The tobacco etch virus 5'leader and poly (A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* 165: 233-238.
- Hajdukiewicz, P, Svab, Z, Maliga, P (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25: 989-994.
- Itoh, Y, Haas, D (1985) Cloning vectors derived from the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Gene* 36: 27-36.
- Jefferson, RA, Kavanagh, TA, Bevan, MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and aversatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jefferson, RA (1993) Plant promoter-alpha-glucuronidase gene construct. United States Patent 5,268,463
- Mason HS, DeWald D, Mullet JE (1993) Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter. *The Plant Cell* 5: 241-251
- Odell JT, Nagy F, Chua NH. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 6: 810-812
- Thompson, CJ, Movva, NR, Tichard, R, Crameri, R, Davies, JE, Lauwereys, M (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523.
- Vancanneyt, G, Schmidt, R, O'Connor-Sanchez, A, Willmitzer, L, Rocha-Sosa, M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220: 245-250.
- White, J, Chang, SY, Bibb, M, Bibb, M (1990) A cassette containing the bar gene of *S. hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucl Acids Res* 18: 1062.
- Wilson, T (1999) Untranslated leader sequences from RNA viruses as enhancers of translation. US patent #5,891,665
- Zambryski, P, Depicker, A, Kruger, K, Goodman, H (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:361-370