

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINARIA - FAV

Estratégias de Transformação Genética de Tomateiro via
Agrobacterium tumefaciens

ALINE RODRIGUES DE SOUSA

BRASÍLIA – DF
2015

ALINE RODRIGUES DE SOUSA

Estratégias de Transformação Genética de Tomateiro via *Agrobacterium tumefaciens*

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Banca Examinadora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária como exigência final para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Michelle Souza Vilela

BRASÍLIA – DF
2015

ESTRATÉGIAS DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE TOMATEIRO VIA
Agrobacterium tumefaciens

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO
AGRÔNOMO.

APROVADO PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

MICHELLE SOUZA VILELA, Dr^a. Universidade de Brasília
Professora, Doutora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB
(ORIENTADORA) CPF: 919.623.401-23; e-mail: michellevilelaunb@gmail.com

GLAUCIA BARBOSA CABRAL, Dr^a. EMBRAPA
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN
(EXAMINADORA) CPF: 398.323924-20; e-mail: glaucia.cabral@embrapa.br

LÍDIA NASCIMENTO QUEIROZ, Msc. UnB
Doutoranda, Instituto de Biologia - UnB
(EXAMINADORA) CPF: 091.258.326-62; e-mail: lidianqz@gmail.com

BRASÍLIA - DF
DEZEMBRO / 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, saúde e cuidado e por me ajudar em todos os momentos da minha vida em que passei por dificuldades.

Agradeço a minha família por me apoiar e sempre me dá forças para seguir nos meus projetos de vida e acadêmicos.

Agradeço os meus amigos pelas horas de lazer e diversão, principalmente a minha irmã Tamires, meu cunhado Ullian pelas barras de chocolate que deixaram minha vida mais doce.

Agradeço a minha amiga Poliana por sempre me dar conselhos e ânimo nas horas difíceis, amiga você é uma irmã para mim.

As amigas da faculdade agradeço, pelos os momentos em que estudamos juntas, Fernanda Mariana Heloíza, Francielle, Patrícia, Renata e aos meninos também Cadu, Wallas e Caio.

Agradeço a Universidade de Brasília pelas muitas oportunidades de crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço aos professores por nos ensinarem tantas coisas e principalmente pela a paciência de vocês.

Agradeço imensamente a Prof. Dra. Michelle Vilela por aceitar ser minha orientadora na UnB, obrigada pela consideração.

Agradeço a EMBRAPA pela oportunidade de estágio no laboratório de engenharia genética, vou levar o que aprendi por toda minha vida.

Agradeço ao Dr. Francisco Aragão pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, foi uma grande honra.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório por me ajudarem e tirarem minhas dúvidas e me ensinarem também.

Agradeço principalmente a doutoranda Lídia por ter sido uma grande chefe, pela paciência de me ensinar e explicar muita coisa.

Agradeço a Dra. Glaucia Cabral pela confiança, paciência e por toda ajuda que me deu, muito obrigada mesmo, você é uma grande chefe.

Por fim agradeço a todos que passaram pela minha vida e me ajudaram de alguma maneira, seja ela pessoal, acadêmica ou profissional. Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. A cultura do tomateiro	8
2.2. Estratégias de Melhoramento em tomateiro	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Material	12
3.1.1 Vegetal	12
3.1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.1.3 Vetor Binário pCAMBIA3301	12
FIGURA 1	12
3.1.4 Meios de Cultura Utilizados	12
3.2 Obtenção de Explantes	13
3.3 Transformação Genética de Cotilédones e Hipocótilos -	13
TABELA 1	14
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	14
FIGURA 2	15
FIGURA 3	16
FIGURA 4	17
FIGURA 5	18
FIGURA 6	19
5. CONCLUSÃO	19
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

RESUMO

Visando à transformação genética da cultivar de tomate industrial IPA 6 por *Agrobacterium tumefaciens*, várias estratégias foram abordadas neste trabalho. Dois explantes foram utilizados, hipocótilo e cotilédones, e foram submetidos a diferentes tratamentos para intensificar a taxa de transformação genética. Foi testado o uso de sonicação e infiltração, assim como os parâmetros de tempo e intensidade desses tratamentos durante a cocultura líquida. O período da cocultura sólida também foi um parâmetro avaliado. O uso do herbicida glifosinato de amônio como agente seletivo foi testado em substituição ao amplamente utilizado antibiótico canamicina. Todos os tratamentos testados foram avaliados de forma indireta e qualitativa pela expressão do gene repórter *gus*, através de ensaios histoquímicos. Os parâmetros de transformação genética que apresentaram maior expressão do gene *gus* quando os explantes foram submetidos à pressão de seleção do herbicida glifosinato de amônio foram definidos; o que torna este trabalho um ponto de partida para os próximos ensaios de transformação genética da cultivar de tomate industrial IPA 6 com o cassete de RNAi que contém sequências das regiões mais conservadas dos principais vírus que atacam o tomateiro em forma de grampo, para conferir resistência a esses vírus.

Palavras-chave: glifosinato de amônio; organogênese; *gus*; tomate industrial; resistência a vírus.

ABSTRACT: Aiming genetic transformation of industrial tomato cultivar IPA 6 via *Agrobacterium tumefaciens*, several strategies have been addressed in this work. Two explants were used, hypocotyl and cotyledons, and were subjected to different treatments to enhance the genetic transformation rate. The use of sonication and infiltration during liquid co-culture, as well as the parameters of time and intensity of these treatments were tested. The use of ammonium glufosinate as selective agent was also addressed instead of antibiotics. All treatments to increase genetic transformation were evaluated for expression of the *gus* reporter gene by histochemical tests. The genetic transformation parameters were set and showed the highest expression of the *gus* gene under the ammonium glufosinate herbicide selection pressure. This work is a starting point for obtaining genetic modified tomato cultivar IPA Industrial 6 resistant to viroses by RNAi strategy.

Keywords: ammonium glufosinate, organogenesis, *gus*, industrial tomatoes, virus resistance

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais de quase todo o mundo, tanto para consumo *in natura* no cultivo envarado, como para a indústria de processamento, através do cultivo rasteiro, se destacando como uma das hortaliças mais cultivadas no mundo sendo superada apenas pela batata (SANTOS, 2009).

No Brasil e demais países produtores de tomate (*Solanum lycopersicum*), seu cultivo durante todo o ano propicia condições favoráveis ao surgimento de doenças causadas por bactérias, fungos e, principalmente, por vírus (MATOS *et al.*, 2003, HURTADO, ZUBIAUR, AGUILERA, XAVIER, ZERBINI & SILVA, 2012)

A cultura de tecidos é um conjunto de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) em meio nutritivo sob condições assépticas; baseando-se na totipotência das células vegetais somáticas de regenerar e produzir tecidos e/ou órgãos, como brotos, raízes (organogênese) ou embriões somáticos (embriogênese somática) que regeneram uma planta completa em meio de cultivo contendo reguladores de crescimento sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas (CARVALHO & VIDAL, 2003).

A combinação de técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transformação genética têm sido uma ferramenta poderosa para introduzir novas características em plantas. Genes oriundos de diferentes espécies vegetais, animais ou microrganismos podem ser introduzidos de forma controlada no genoma vegetal receptor, de maneira independente da fecundação. O gene responsável pela característica de interesse deve ser localizado, isolado, caracterizado e introduzido em vetores para a transformação de plantas. Existem os métodos amplamente utilizados para a transferência de genes para plantas. Pode se fazer o uso, por exemplo, de bactérias do solo que transferem naturalmente parte de seu genoma às células vegetais, no momento da infecção. As agrobactérias são microrganismos do solo, aeróbicas e gram-negativas (GANDER, 1996 & MONQUERO, 2005). Por meio da manipulação genética do plasmídeo Ti (indutor de tumor), que é o meio pela qual a bactéria faz a infecção nos tecidos das plantas, foi possível a substituição das sequências nativas na região de transferência do plasmídeo (T-DNA) por genes de interesse. Assim, quando as agrobactérias contendo um plasmídeo Ti manipulado infecta uma célula vegetal, ele transferirá o gene de interesse para dentro da célula transformada (BESPALHOK F., GUERRA & OLIVEIRA, 1999) sem causar sintomas da doença.

Um das formas de identificar as células geneticamente modificadas é pelo uso de um gene repórter, sendo os mais usados o gene *gus*, que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS), o gene *lucA* da luciferase e o gene *gfp* (green fluorescent protein). A proteína marcadora mais utilizada é a β -glucuronidase que é a enzima codificada pelo gene *gus* ou *uidA*. A expressão é visualizada pelo contato do tecido transformado com o substrato x-gluc, o substrato sofre hidrólise pela enzima, no que resulta em um produto de coloração azulada. (MONQUERO, 2005 & CARMO, 2003). Os genes marcadores de seleção são necessários para selecionar as células transformadas que originarão uma planta transgênica. Um marcador de seleção permite

o crescimento preferencial das células transformadas na presença do agente seletivo, evitando o crescimento das células não transformadas. Genes que conferem resistência a antibióticos ou herbicidas podem ser usados como marcadores de seleção. Genes de resistência a herbicidas também tem sido utilizados com frequência como marcadores de seleção. Entre os mais usados temos o gene *bar* que confere resistência ao herbicida Basta ® (princípio ativo fosfonotricina ou PPT) (BESPALHOK, 1999) e o gene *nptII* ou *neo* que codifica para a neomicina fosfotransferase II (NPT II) e confere resistência ao antibiótico canamicina. A transformação de plantas com o uso de genes que conferem resistência a antibióticos não é desejável quando há interesse em se desenvolver cultivares comerciais, pois há resistência com relação às normas de biossegurança, por questões de percepção pública. Por esse motivo foi utilizado glifosinato de amônio para testar sua eficiência como agente seletivo no sistema de organogênese de tomateiro.

Há vários trabalhos publicados descrevendo protocolos de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* em *Lycopersicon esculentum*, desde 1986 (McCormick *et al.*, 1986; Chyi e Phillips, 1987; Fillatti *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1991a; Davis *et al.*, 1991b; Hamza e Chupeau, 1993; Van Roekel *et al.*, 1993; Patil, 1994; Frary, 1995; Frary e Earle, 1996, COSTA, NOGUEIRA, OTONI e BROMMONSCHENKEL, 2000).

No entanto, a resposta à regeneração e transformação genética é sabidamente genótipo-dependente, sendo crucial o conhecimento de resposta de cada genótipo a ser trabalhado, por isso, e com base na literatura, vários parâmetros e estratégias foram testados para otimização dessas metodologias para a cultivar IPA 6. Este trabalho teve como objetivo testar a eficiência de transformação genética do tomateiro IPA6 por *Agrobacterium tumefaciens* para no futuro próximo se obter plantas transgênicas resistentes a vírus usando a estratégia de RNAi.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CULTURA DO TOMATE

O tomateiro é de origem Andina da América do Sul, foi domesticado no México e introduzido na Europa por volta dos anos 1500 e mais tarde foi disseminado para outras partes do mundo (NAIKA, 2006).

No Brasil, seu hábito de consumo foi introduzido por imigrantes europeus no final do século XIX. Hoje, a cultura do tomate está quase que espalhada por todo o mundo. O tomate começou a ter relevância mundial a partir de 1900 e, atualmente, é o segundo produto olerícola mais cultivado no mundo, sendo que a quantidade produzida é superada apenas pela batata, que juntamente com a cebola e o alho são os alimentos mais industrializados e consumidos in natura (FILGUEIRA, 2000 e SANTOS, 2009).

O tomateiro e suas espécies selvagens são plantas dicotiledôneas da família Solanaceae, do gênero *Solanum* L. sect. *Lycopersicon* (Mill.) Wettst. A família Solanaceae é extremamente diversificada e engloba, atualmente, cerca de 90 gêneros e 1.700 espécies (Weese & Bohs, 2007). O tomateiro e espécies silvestres afins são originários da parte ocidental da América do

Sul, com dispersão geográfica abrangendo Peru, Chile e Equador, incluindo as Ilhas Galápagos. Os tomateiros ocupam uma ampla gama de condições ambientais, variando desde a costa árida do Pacífico, passando por encostas úmidas e regiões montanhosas na Cordilheira dos Andes com ocorrência em altitudes superiores aos 3.300 m em relação ao nível do mar (SANTOS, 2009).

As condições mais adequadas para o desenvolvimento do tomateiro são observadas em épocas ou locais de temperaturas amenas, pouca precipitação pluvial e baixa umidade relativa do ar. No entanto, a planta suporta uma amplitude térmica de 10°C a 34°C, sendo que a média ideal para cultivo fica em torno de 21°C (BOITEUX, 2012 & CARVALHO, 2014).

A cultura do tomate é formada por duas cadeias produtivas distintas, caracterizadas pelos segmentos de mesa, destinado ao consumo *in natura*, e da indústria, destinado ao processamento. Cada cadeia produtiva possui características intrínsecas na produção, beneficiamento, processamento e comercialização, desde as cultivares utilizadas até as formas de cultivo e consumo final (SANTOS, 2009).

O Brasil ocupa o nono lugar no ranking mundial com uma produção de 3,69 milhões de toneladas, equivalente a 2,53% do total produzido, enquanto que a produtividade média fica em 61.933 quilos por hectare (AGRIANUAL, 2013). O principal Estado produtor em 2012 foi Goiás, que contribuiu com 1,145 milhão de toneladas da hortaliça. Igualmente representativos são os estados de São Paulo (656.055 toneladas), Minas Gerais (444.693 toneladas), Paraná (342.280 toneladas) e Rio de Janeiro (195.627 toneladas) (IBGE, 2013).

2.2 DOENÇAS DO TOMATEIRO CAUSADAS POR VÍRUS

As principais doenças viróticas que atacam o tomateiro são aquelas causadas por espécies classificadas como Tospovirus, Potyvirus, Begomovirus, Crinivirus, Tobamovirus e Cucumovirus (Lopes & Ávila, 2005). Essas espécies, em infecções simples ou mistas, podem conduzir a lavoura a severas perdas e aumento do custo de produção.

O principal agente transmissor de vírus para o tomate é a mosca branca, *Bemisia tabaci* (Brown et al., 1995), que em certas condições climáticas, associadas à grande diversidade de espécies de plantas hospedeiras, favorecem a manutenção de populações de mosca-branca, durante todo o ano e sem interrupção do seu ciclo de vida. Dentre as mais de 700 espécies de plantas colonizadas por essa praga (Ferreira et al., 1998), o tomate apresenta-se como uma das culturas mais infestadas pela mosca branca, pela severidade dos danos diretos e pela transmissão de doenças viróticas, com grande impacto socioeconômico em todo o mundo (áreas tropicais, subtropicais e temperadas) (HAJI, 2005).

O desenvolvimento da mosca-branca é influenciado pelo período quente e seco, sendo que a precipitação pluviométrica contribui para a redução de sua população. Na cultura do tomate, os sintomas podem ser manifestados pela liberação de excreções açucaradas que favorecem o desenvolvimento de fumagina nas folhas, reduzindo o processo fotossintético, afetando a produção e a qualidade dos frutos (Salguero, 1993). A mosca-branca é praga vetora

de vírus, principalmente os pertencentes ao grupo dos geminivírus (HAJI, MATTOS, ALENCAR, BARBOSA e PARANHOS, 2005).

O gênero Begomovirus está classificado na família Geminiviridae juntamente com outros seis gêneros: Becurtovirus, Curtovirus, Eragrovirus, Mastrevirus, Topocuvirus e Turncurtovirus (ICTV, 2013). Os principais critérios para separação destes gêneros são a organização do genoma, as plantas hospedeiras e o tipo de inseto vetor (Adams et al., 2013, Brown et al., 2011, Fauquet et al., 2008, Gutierrez, 1999, Hernández-Zepeda et al., 2013, Heydarnejad et al., 2013). O gênero Begomovirus é o mais importante, contando com um maior número de espécies e maior gama de hospedeiras (Morales & Anderson, 2001, Moriones & Navas-Castillo, 2000, Polston & Anderson, 1999, Freitas Astua et al., 2002). De acordo com ICTV (2011), 276 espécies fazem parte deste gênero, sendo 192 espécies definitivas e 84 espécies tentativas (Brown et al., 2011). Os begomovírus provocam perdas expressivas no tomateiro e em outras culturas de importância econômica como pimentão (*Capsicum annum*), caupi (*Vigna unguiculata*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), algodão (*Gossypium hirsutum*), mandioca (*Manihot esculenta*) e fava (*Phaseolus lunatus*) (Silva, 2006, Faria & Zerbini, 2000). Espécies de Begomovirus são consideradas os principais patógenos virais no cultivo do tomateiro em muitas regiões no Mundo (Brown et al., 1995, Seal et al., 2006), (CARVALHO 2014).

Os principais sintomas causados pela infecção de espécies do gênero Begomovirus em plantas de tomate consistem em mosaicos, clorose e amarelecimento internerval, epinastias, encarquilhamento e nanismo (CARVALHO, 2014).

2.3 ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO EM TOMATEIRO

Diferentes espécies do gênero *Solanum* (sect. *Lycopersicon*) vêm sendo utilizadas em programas de melhoramento de tomateiro, visando a introdução de genes que conferem resistência a pragas e doenças, melhoria da qualidade nutricional e nutracêutica dos frutos e tolerância a estresses abióticos (CARVALHO, 2014).

A transformação genética é a transferência de um ou vários genes em um organismo sem que tenha necessidade da fecundação ou do cruzamento. Os organismos transformados geneticamente recebem o nome de transgênicos e os genes inseridos são denominados de transgenes. Estes organismos também são chamados de organismos geneticamente modificados (OGMs). Deste modo, vegetais transformados geneticamente são chamados de plantas transgênicas (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

A transformação genética em vegetais só foi possível com o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecido vegetais. Essas técnicas possibilitam a regeneração de uma planta a partir de uma única célula ou um grupo de células. Os métodos de transformação de plantas podem ser divididos em: indiretos - através do uso da *Agrobacterium tumefaciens*, e diretos - bombardeamento ou eletroporação (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

É necessário seguir algumas etapas para a obtenção de uma planta transgênica que podem ser resumidas em: (a) isolamento e clonagem de um gene de interesse; (b) transferência desse gene para a célula vegetal; (c) integração desse gene no genoma da planta; (d) regeneração de plantas a partir da célula transformada; (e) expressão do gene introduzido nas plantas regeneradas; (f) transmissão do gene introduzido de geração em geração (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

A transferência de DNA por meio da *Agrobacterium tumefaciens* é um dos métodos mais usados na obtenção de plantas transgênicas dicotiledôneas. A *Agrobacterium tumefaciens* é uma bactéria gram-negativa que possui um plasmídeo (DNA extracromossomal) chamado de plasmídeo Ti (indutor de tumor) que possui a habilidade de transferir uma parte de seu DNA para a célula vegetal. Esse DNA é chamado de T-DNA, e contém genes envolvidos na produção de reguladores de crescimento vegetais. Em condições naturais, quando o T-DNA é transferido para a célula vegetal onde essa célula produzirá substâncias que servem de alimento (opinas) para o patógeno e levam a célula vegetal a se multiplicar, formando tumores ou calos (BESPALHOK, GUERRA & OLIVEIRA, 1999).

A transformação genética mediada por *Agrobacterium* geralmente é feita em tecidos vegetais tais como folhas, cotilédone, hipocótilo, embriões e outras partes que tenham a capacidade de se regenerar. Em geral, coloca o *Agrobacterium* em cocultivo com o tecido a ser transformado por 2 a 7 dias, sendo em seguida transferido para meio com agente seletivo com a finalidade de selecionar as células transformadas e eliminar a bactéria, que serão então regeneradas (BESPALHOK, 1999).

O gene *bar* codifica a enzima PAT (phosphinothricin-N-acetyltransferase) de *Streptomyces hygroscopicus* (Murakani et al., 1986) que confere resistência ao glifosinato de amônio (PPT), que é usado como agente seletivo. O glifosinato de amônio é utilizado como herbicida, sendo um dos mais amplamente empregados pela engenharia genética no desenvolvimento de OGMs vegetais (SOUZA, VENTUROLI, COELHO & RECH 2001). A enzima PAT inativa os herbicidas que contém o PPT como composto ativo por meio da detoxificação. Segundo (SOUZA, 2001) a detoxificação é resultado da acetilação do agrupamento amino livre no PPT que o torna incapaz de competir de forma inibitória com a glutamina sintetase (GS), o que possibilita a remoção da amônia tóxica da célula vegetal pela conversão de glutamato em glutamina.

As técnicas de cultura de tecidos em vegetais têm contribuído aos estudos de fisiologia, bioquímica, histologia, embriogênese, genética e melhoramento, bem como na produção de metabólitos de interesse e também na obtenção de plantas resistentes a fatores adversos como pragas e doenças (TORRES, 1998; OLIVEIRA, 2000; SOUZA, 2006, CAMPOS, 2009). A regeneração é fundamentada na capacidade de proliferação das células vegetais que se organizam em tecidos e conseqüentemente formando a planta, e a capacidade das células vegetais é chamada de totipotência, definida como a habilidade que uma célula ou grupo de células têm de responder ao estímulo indutivo visando o seu desenvolvimento (ANDRADE, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* foram realizados na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia no Laboratório de Engenharia Genética, localizada em Brasília-DF, no período de janeiro a março do ano de 2015.

3.1 Material

3.1.1. Vegetal

Sementes maduras comerciais da variedade de tomate IPA 6 da marca ISLA PRO

3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Linhagem EHA105 contendo o vetor pCAMBIA3301 –

3.1.3. Vetor binário pCAMBIA3301

Este vetor possui o cassete de expressão com gene marcador de seleção *bar* e o gene repórter *gus* (β - glucuronidase) inseridos na região do T- DNA (Figura 1).

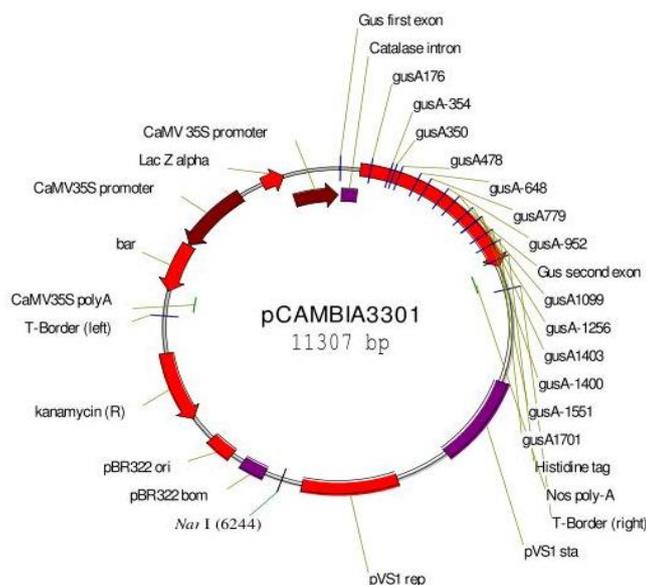


Figura 1 – Representação esquemática do vetor pCAMBIA3301 que contém os genes *gus* e *bar*, sob o controle do promotor constitutivo CaMV35S.

3.1.4. Meios de cultura utilizados

Meio de Germinação: Sais de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarose 3%, ágar 0,72%, pH 5,8. Depois de autoclavado, foi adicionado ao meio a vitamina B5 (Gamborg, 1968).

Meio AB: Glicose 5 g/L, Difco Bacto Ágar 1,5 %, depois de autoclavado foi adicionado ao meio, tampão e sais de AB e os antibióticos canamicina 100 mg/L e rifampicina 100 mg/L.

Meio Cocultura líquido: Sais de meio MS (Murashige & skoog, 1962), glicose 10 g/L, vitamina de B5 (Gamborg, 1968) pH 5,2. O meio foi esterilizado por filtração usando filtro de 0,22 µm e foi adicionado acetoseringona 200 µM e zeatina 1 mg/L.

Meio Cocultura Sólido: Sais de meio MS (Murashige & skoog, 1962), glicose 10 g/L, ágar 0,8 %, pH 5,2; depois de autoclavado foi adicionado acetoseringona 200 µM e zeatina 1mg/L, e antioxidantes, L-cisteína 4 g/L, DTT 0,154 g/L, Tiosulfato de Sódio 0,158 g/L.

Meio de Indução de Organogênese: Sais de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), Sacarose 3%, vitamina B5 (Gamborg, 1968), ágar 0,72% pH 5,8. Depois do meio autoclavado foi adicionado cefotaxina 100 mg/L, timentim 150mg/L, zeatina 1mg/L, AIA 0,1 mg/L. Foram preparados meios de indução com diferentes concentrações de glifosinato de amônio conforme Tabela 1.

3.2. Obtenção de Explantes – Cotilédones e Hipocótilos

Aproximadamente 300 sementes foram desinfestadas em Etanol 70% (v:v) por um minuto sob agitação em tubo tipo Falcon™ de 15 mL. Após descarte do etanol, foi adicionada uma solução contendo hipoclorito de sódio comercial 2,5% com duas gotas de Tween 20, sob agitação por 10 minutos; após a desinfestação foram realizadas quatro lavagens com água destilada autoclavada. Depois deste processo as sementes foram postas para secar em placa de Petri sob papel filtro autoclavado. Em seguida, foram inoculadas em meio de germinação por aproximadamente 15 dias ou desenvolvimento completo dos cotilédones e hipocótilo, antes do aparecimento das folhas definitivas. Os frascos contendo as sementes foram cultivados em câmara de cultura a 25 ± 1 °C sob fotoperíodo de 16 h. Todo o processo foi feito em câmara de fluxo laminar para não haver contaminação do material esterilizado e desinfestado.

3.3 Transformação Genética de Cotilédones e Hipocótilos via *A. tumefaciens*

A linhagem EHA105 foi previamente transformada com o vetor pCAMBIA3301, tendo sido crescida em meio AB sólido por 2 ou 3 dias a 28 °C antes do dia da cocultura. A linhagem EHA105 pCAMBIA3301 formou um crescimento viscoso e denso na superfície do meio, as bactérias foram coletadas com espátula e suspensas em 15 ml de meio de cocultura líquida em tubo tipo Falcon de 50 mL. A suspensão bacteriana foi completamente homogeneizada em agitador do tipo Vortex™ e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm. A densidade ótica (DO) da suspensão bacteriana foi ajustada para 0,5 e sendo mantida a temperatura ambiente por 30 minutos para a ativação dos genes *vir* da *Agrobacterium tumefaciens*.

Após o período de ativação a suspensão bacteriana foi transferida para placa de Petri onde os explantes obtidos, cotilédones e hipocótilos, foram apenas cortados ou receberam

tratamento para causar lesões, como sonicação e infiltração, como mostrado na Tabela 1. A Tabela 1 evidencia todos os tratamentos testados visando à otimização da transformação genética de tomate. Um dos tratamentos empregados consistiu de sonicação seguida de agroinfiltração (SAAT - *Sonication and agroinfiltration*). Os explantes foram incubados na suspensão de agrobactérias e permaneceram imersos por 20 minutos, com ou sem agitação em plataforma orbital, ou ainda com ou sem sonicação/infiltração, sendo que após este período os explantes foram transferidos para papel filtro autoclavado até adquirirem aparência desidratada. Após os tratamentos da cocultura líquida, os explantes foram transferidos para meio de cocultura sólida, em placa de Petri fechada com Parafilm™ e incubadas por 3-5 dias no escuro a 20 °C (Tabela 1). Após o período de cocultura sólida, parte dos explantes foram usados para análise da expressão do gene *gus* por teste histoquímico, enquanto a outra parte foi transferida para meio de indução de organogênese (MIO), contendo glifosinato de amônio (GA) nas concentrações de 1,0, 1,5 ou 2,0 mg/L, de acordo com curva de seleção pré-estabelecida. Cultivados a 25-26°C em fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 1 - Tratamentos testados visando à otimização da transformação genética de tomate

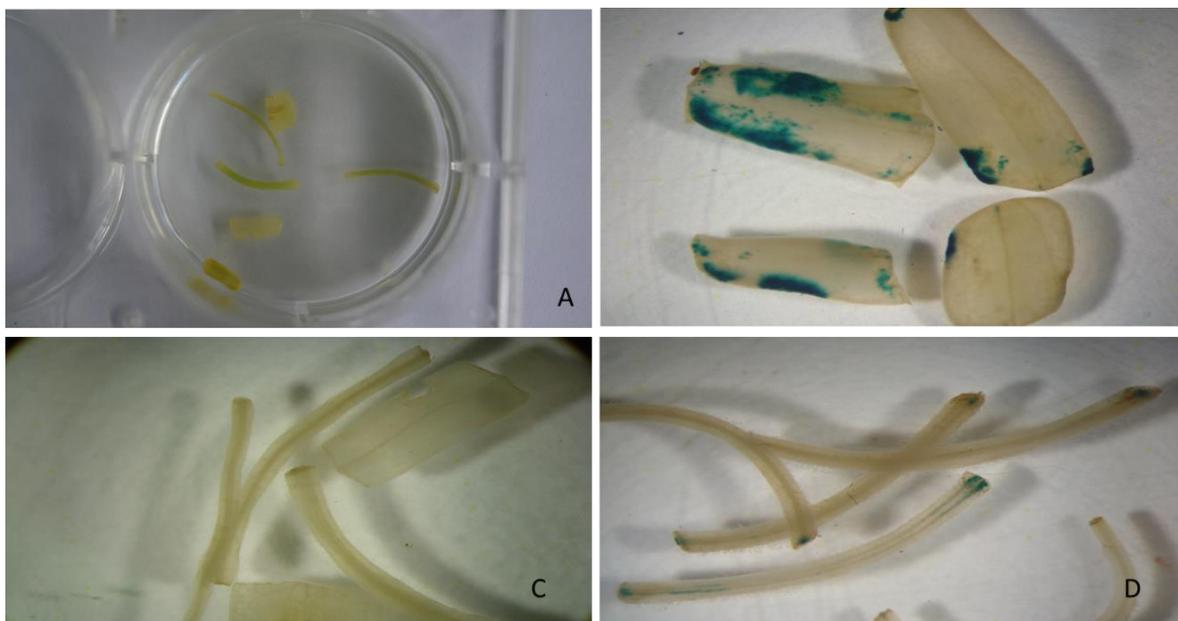
	Agitação durante CCL	Sonicação	Agroinfiltração a vácuo	CCS com ou sem AO	Período CCS (dias)	[GA] COT	[GA] HIP
Tratamento 1	Velocidade baixa por 20'	Não	Não	Sem AO	3	1	2
Tratamento 2	Não	COT: 15seg HIP: 30seg	10' 550mmHg	Sem AO	3	1	2
Tratamento 3	Não	COT: 10seg HIP: 15seg	2' 250mmHg	Com AO	3	1	2
Tratamento 4	Não	COT: 10seg HIP: 15seg	2' 250mmHg	½ AO, ½ Sem AO	4	1,5	2
Tratamento 5	Não	COT: 10seg HIP: 15 seg	2' 250mmHg	Sem AO	5	1,5	2

CCS = cocultura sólida; CCL = cocultura líquida; AO = antioxidante; COT = cotilédone; HIP = hipocótilo; GA = glifosinato de amônio; MIO = meio de indução de organogênese

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

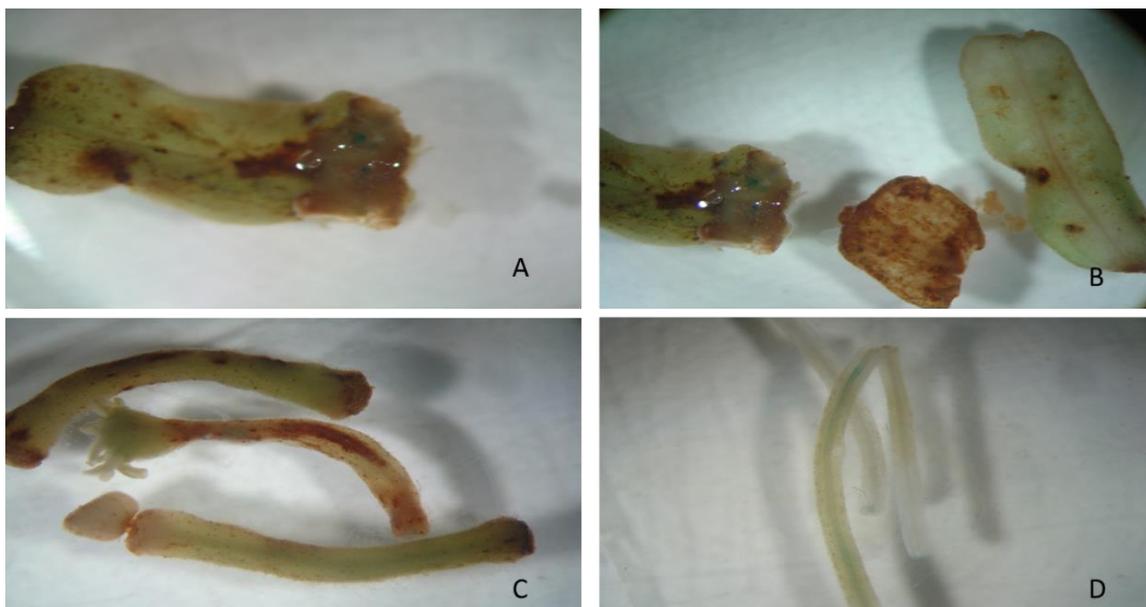
Como pode ser observado na Tabela 1, foram utilizadas cinco estratégias de transformação genética. O primeiro tratamento foi avaliado 1 dia após a cocultura sólida (CCS), no qual foram observadas áreas relativamente grandes de expressão transiente do gene *gus* em alguns cotilédones (Figura 2). Quinze dias após a CCS nenhum broto transgênico foi detectado dentre os que regeneraram entre os pontos azuis que já expressavam estavelmente o gene *gus*. Quanto aos hipocótilos, tanto na expressão transiente como estável foi observado nos explantes

a expressão do gene *gus* apenas na parte interna, ou seja, na região de vasos dos hipocótilos (Figura 2D e 3).



Fonte: Laboratório de Engenharia Genética- Cenargen, 27. 01. 2015

Figura 2: Expressão transiente do gene *gus* 1 dia após a CCS de explantes submetidos ao tratamento 1 para transformação genética por *A. tumefaciens*: A e C = controles; B e D = transformados com *A. tumefaciens*, cotilédones e hipocótilos, respectivamente.



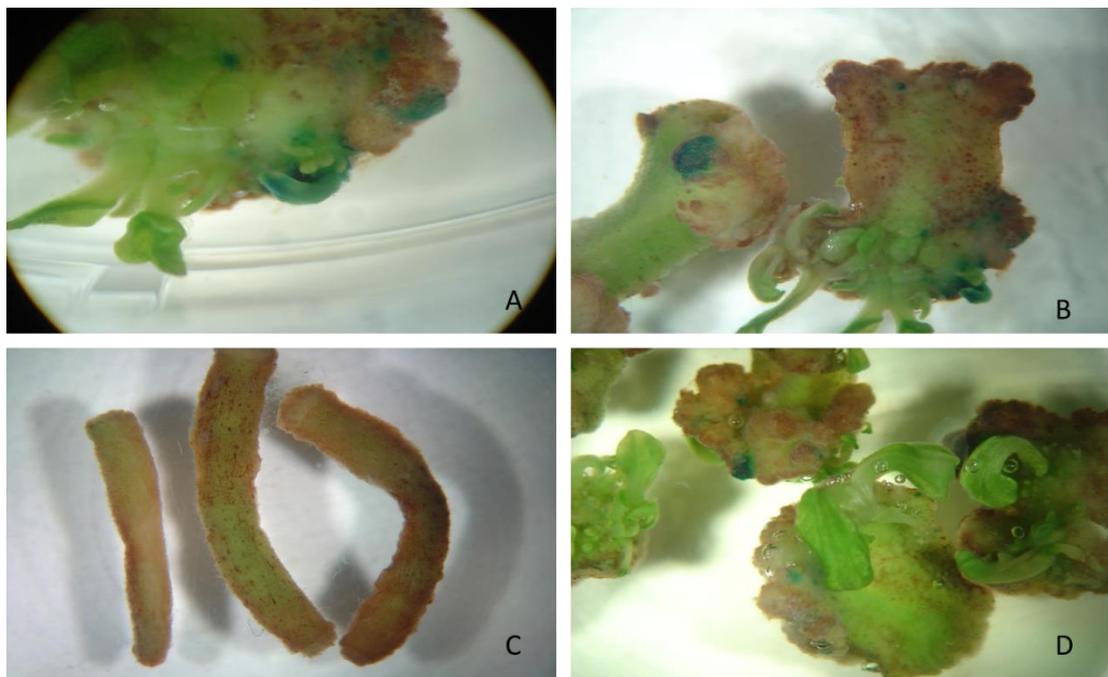
Fonte: Laboratório de Engenharia Genética- Cenargen, 11. 02. 2015

Figura 3: Expressão estável do gene *gus* 15 dias após a CCS de explantes submetidos ao tratamento 1 para transformação genética por *A. tumefaciens*: A e B = cotilédones transformados com *A. tumefaciens* com pouca expressão; C e D = hipocótilos com pouca expressão concentrada na região de vasos, apresentando regeneração de gemas não transgênicas em C.

O Tratamento 2 quando avaliado um dia após a CCS foi observado níveis baixos de expressão do gene *gus*, poucos pontos azuis, tanto em cotilédones quanto em hipocótilos, sendo que nos hipocótilos os pontos se concentraram no interior dos vasos. Os explantes que foram cultivados por 23 dias sob pressão de seleção na presença do herbicida GA apresentaram aumento das regiões com expressão do gene *gus*, em explantes cotiledonares, sendo que foi possível detectar um broto quimérico e uma possível gema azul (Figura 4A, B e D). No tratamento 2 foi empregada a metodologia SAAT pela primeira vez, e as condições podem ter sido drásticas para os tecidos, o que explica o fato de não ter havido uma expressão transiente do gene *gus* tão expressiva 1 dia após a CCS. Porém, 23 dias depois a expressão estável do gene *gus* havia aumentado consideravelmente. Isto pode ter ocorrido devido à pressão de seleção do herbicida favorecendo as células transformadas dos explantes que tiveram um tempo para regenerarem no meio de indução, favorecendo o aumento da área de expressão.

Na literatura analisada a seleção de plantas transgênicas, principalmente em tomate, é feita com o uso de antibióticos, como por exemplo a canamicina, usada com maior frequência.

O fato de termos obtido brotos quiméricos podem estar relacionados ao herbicida não ser bem translocado entre os tecidos do explante, e também ao fato de não ter havido muitas repicagens dos explantes no meio de indução de organogênese para favorecer o aumento de proporção de tecidos transformados em relação aos não transformados.



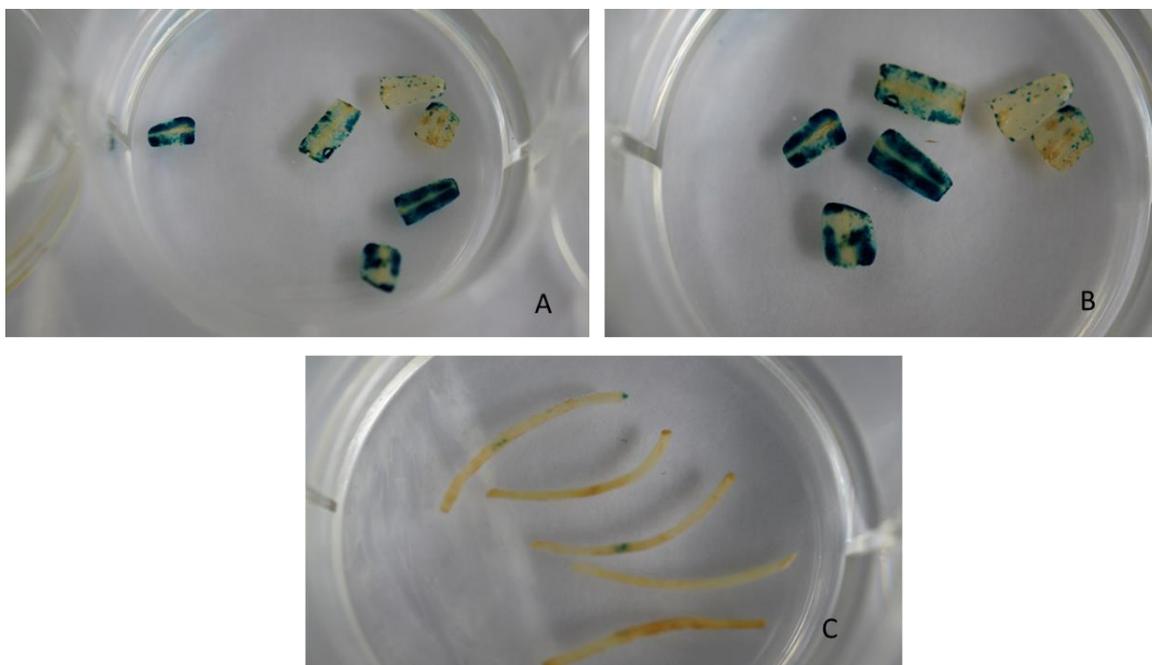
Fonte: Laboratório de Engenharia Genética- Cenargen, 20.02.2015

Figura 4. Expressão estável do gene *gus* 20 dias após a CCS de explantes submetidos ao tratamento 2 para transformação genética por *A. tumefaciens*: A, B e D = cotilédones transformados com *A. tumefaciens* áreas azuis e regeneração de brotos quiméricos e não transformados; C = hipocótilos com pouca expressão concentrada na região de vasos.

No tratamento 3 os explantes foram incubados por três dias nas condições utilizadas para CCS de soja (BAP, antioxidante + sais reduzidos), e foi observado que em cotilédones houve pontos de expressão do gene *gus* internos no tecido e até nas extremidades não lesionadas dos explantes. Já nos hipocótilos foi observada a expressão na parede dos vasos de um explante. Com o tempo os explantes ficaram amarelados até morrerem no meio de indução, o que pode estar relacionado às condições do meio de CCS com antioxidantes (AO) que aparentemente foram deletérios para explantes de tomate IPA6 (resultados não mostrados).

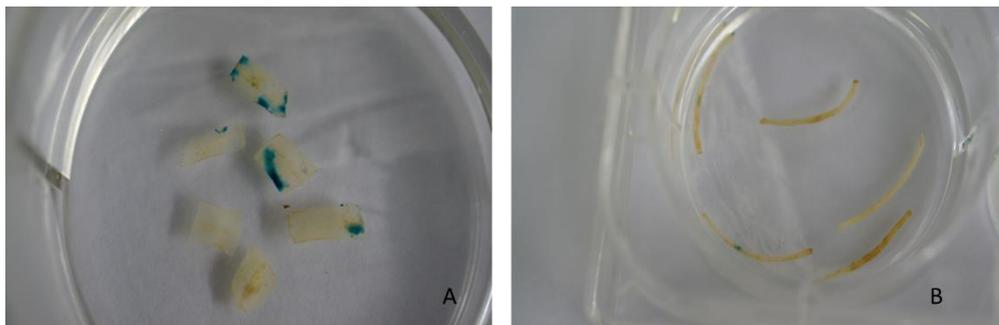
No tratamento 4 os explantes foram divididos em dois meios de CCS: sem AO e com AO. Nos explantes incubados sem AO por 4 dias na CCS, foi observado um efeito positivo,

resultando no aumento da expressão do gene *gus* (Figura 5); enquanto que os explantes incubados na CCS com antioxidantes exibiram menores níveis de expressão do gene *gus* quando avaliados 1 dia após CCS, comparado com as outras estratégias. Provavelmente devido ao efeito deletério dos AO nos explantes de tomate IPA6 (Figura 6). No tratamento 4 o SAAT foi menos drástico do que no tratamento 2, e os explantes permaneceram por 4 dias na CCS, o que favoreceu a transformação, tendo havido uma boa expressão do gene *gus* em várias áreas do tecido cotiledonar, não ficando restrita à área cortada. O período maior de CCS propiciou uma maior expressão do gene *gus* em explantes cotiledonares de tomate, provavelmente pela maior exposição dos explantes à citocinina.



Fonte: Laboratório de Engenharia Genética- Cenargen, 04. 03. 2015

Figura 5. Expressão transiente do gene *gus* 1 dia após a CCS sem AO de explantes submetidos ao tratamento 4 para transformação genética por *A. tumefaciens*: A e B = cotilédones transformados com *A. tumefaciens* com muitas áreas azuis; C = hipocótilos com pouca expressão concentrada na região de vasos.



Fonte: Laboratório de engenharia Genética- Cenargen, 04. 03. 2015

Figura 6: Expressão transiente do gene *gus* 1 dia após a CCS com AO de explantes submetidos ao tratamento 4 para transformação genética por *A. tumefaciens*: A = cotilédones transformados com *A. tumefaciens* com muitas áreas azuis; B = hipocótilos com pouca expressão concentrada na região de vasos.

No Tratamento 5 foram utilizados os mesmos parâmetros do Tratamento 4 só que os explantes ficaram por cinco dias na CCS sem AO. O ensaio de *gus* foi realizado 8 dias após a CCS e a expressão do gene *gus* foi um pouco menor comparada com o tratamento 4 (Resultados não mostrados).

5 CONCLUSÃO

Os melhores resultados obtidos dentre os parâmetros testados foram dos tratamentos 2 e 4. Resumindo, do que foi testado podemos concluir que o melhor explante para transformação genética de IPA6 é cotilédone. E que as condições de transformação genética são CCL com sonicação por 10 seg e agroinfiltração por 2 min a 250mmHg de vácuo, sendo a CCS Sem AO realizada por 4 dias, após os quais os explantes devem ser cultivados sob pressão de seleção de GA de 1,5 mg/L seguido de GA 2 mg/L para reduzir a obtenção de quimerismo que foi observado no tratamento 2 e selecionar melhor as gemas e brotos transformados por sucessivas repicagens.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso dessas estratégias teve como base a literatura e a avaliação do melhor método de transformação genética do IPA 6. Essa avaliação alcançou o objetivo que foi testar as condições de transformação do tomate para no futuro serem usadas na obtenção de plantas transgênicas resistentes a vírus usando a estratégia de RNAi.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuário Brasileiro de Hortaliças 2013 / Cleonice de Carvalho ... [et al.]. – Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 88 p. : il. ISSN 2178-0897 1. Horticultura - Brasil. 2. Hortaliças. I. Carvalho, Cleonice de.

BESPALHOK F., J.C.; GUERRA, E.P.; OLIVEIRA, R. Introdução ao Melhoramento de Plantas. Cap. 5.2, pág.15 In: 1 ed, 1999

CAMPOS, Vania Celene Alecrim C218m Micropropagação de *Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith / Vania Celene Alecrim Campos. – Feira de Santana - BA, 2009. f. il.

CARMO, Lilian Silveira travassos do, 2003 Transformação Genética do Mamoeiro: 15 anos de sucesso, Lilian Silveira Travassos, Manoel Teixeira de Souza Júnior- Brasília; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, - p-(Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ISSN 0102-0110; n. 100)

CARVALHO, Rita de Cássia Pereira, TOBAR, Leidy Lorena Mendoza, DIANESE, CAMPOS, Erico de, FONSECA, Maria Esther de Noronha, BOITEUX, Leonardo Silva. Melhoramento Genético do Tomateiro para Resistência a Doenças de Etiologia Viral: Avanços e Perspectivas. RAPP - Volume 22, 2014

CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas, e VIDAL, Márcia Soares, . Campina Grande, 2003. Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais por 39p. (Embrapa Algodão, Campina Grande, PB. Documentos, 116). 1. Tecido - Cultura. 2. Biotecnologia. I. Carvalho, J.M.F.C. II. Vidal, M.S. III. Título. IV. Série. CDD 660.6

COSTA, Marcio Gilberto Cardoso, NOGUEIRA, Fabio Tebaldi, SILVEIRA, OTONI, WAGNER CAMPOS, e BROMMONSCHENKEL, SÉRGIO HERMÍNIO, 2000. Transformação Genética de Cultivares de Tomateiro Industrial Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* R. Bras. Fisiol. Veg., 12(2):107-118, 2000.

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB). Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Márcia Soares Vidal. Campina Grande, 2003. 39p. (Embrapa Algodão. Documentos, 116).

GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.23, n.3, p.815-818, jul-set 2005.

HAJI, Francisca Nemauro Pedrosa, MATTOS, Marco Antônio de Azevedo, ALENCAR, José Adalberto de, BARBOSA, Flávia Rabelo, PARANHOS, Beatriz Jordão Circular técnica, Embrapa 2005 Petrolina, PE Outubro, 2005

HURTADO F D; GILMA; ZUBIAUR YM; AGUILERA JG; XAVIER CAD; ZERBINI JUNIOR FM; SILVA DJH. 2012. Fontes de resistência em tomateiro aos begomovírus bissegmentados *Tomato yellow spot virus* e *Tomato severe rugose virus*. *Horticultura Brasileira* 30: 639-644.

MONQUERO, Patrícia Andréa, 2005. Plantas Transgênicas Resistentes aos Herbicidas: Situação e Perspectivas. *Bragantia*, Campinas, v.64, n.4, p.517-531, 2005

NAIKA, Shankara, Joep van Lidt de Jeude, Marja de Goffau, Martin Hilmi, Barbara van Dam Editor: Barbara van Dam Ilustrações: Barbera Oranje Design gráfico: Eva Kok Tradução: Rob Barnhoorn; revisão: Láli de Araújo Impresso por: Digigrافي, Wageningen, Países Baixos, 2006

QUISEN, Regina Caetano. Manual de Procedimentos do Laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia ocidental / Regina Caetano Quisen, Paula Cristina da Silva Ângelo. Manaus :Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p- (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos ; 61)

SANTOS, Fabrício Franco Baccaglioni dos. Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando à resistência ao *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV). 2009. 75f. Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Pós-Graduação – IAC.

SOUZA JÚNIOR, M. T.,; VENTUROLI, M. F. ; COELHO, M. C. F. , RECH FILHO, E. L., 2001, Análise de Sistemas Gene Marcador/ Agente Seletivo Alternativos para Seleção Positiva de Embriões Somáticos Transgênicos de Mamoeiro Laboratório de Transformação e Expressão de Genes, Cenargen, Embrapa. R. Bras. Fisiol. Veg., 13(3):365-372, 2001