

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

LETÍCIA REIS

**TESTES DE SENSIBILIDADE E CONSTRUÇÃO DE CASSETE DE EXPRESSÃO
VISANDO O SILENCIAMENTO GENICO DO RECEPTOR DE ETILENO *FaETR1*
EM *Fragaria x ananassa* L. Duch.**

PONTA GROSSA

2014

LETÍCIA REIS

**TESTES DE SENSIBILIDADE E CONSTRUÇÃO DE CASSETE DE EXPRESSÃO
VISANDO O SILENCIAMENTO GENICO DO RECEPTOR DE ETILENO *FaETR1*
EM *Fragaria x ananassa* L. Duch.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para a obtenção parcial do título de Mestre.

Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

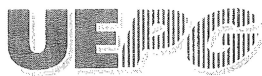
Reis, Letícia

R375 Testes de sensibilidade e construção de
 cassete de expressão visando o
 silenciamento genico do receptor de
 etileno faetr1 em Fragaria x Ananassa 1.
 Duch./ Letícia Reis. Ponta Grossa, 2014.
 75f.

 Dissertação (Mestrado em Agronomia -
 Área de Concentração: Agricultura),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio
 Ayub.
 Coorientador: Prof. Dr. Rafael Mazer
 Etto.

 1.Fragaria x ananassa. 2.Silenciamento
 gênico. 3.Organogenese e cultura de
 tecidos. I.Ayub, Ricardo Antônio. II.
 Etto, Rafael Mazer. III. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
 Agronomia. IV. T.

CDD: 634.75



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

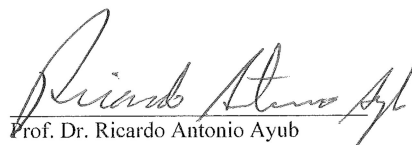
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Testes de sensibilidade e construção de cassete de expressão visando o silenciamento gênico do receptor de etileno *FaETR1* em *Fragaria x ananassa* L. Duch”.

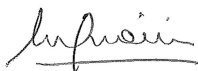
Nome: Letícia Reis

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

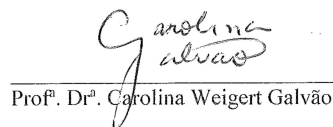
Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub



Prof.ª. Dr.ª. Marguerite Quoirin



Prof.ª. Dr.ª. Carolina Weigert Galvão

Data da Realização: 05 de fevereiro de 2015.

DEDICO

Aos meus pais Paulo e Cleide e ao meu irmão Erick,
pelo amor, carinho e apoio. Por acreditarem na minha
escolha e me acompanharem nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e força de me manter firme nesta caminhada.

Aos meus Pais Paulo e Cleide e ao meu irmão Erick por me apoiarem e acreditarem na minha escolha tanto quanto eu, me dando força e amparo para continuar. Obrigada por estarem sempre tão presentes na minha vida e nas minhas escolhas.

À todos os meus familiares que sempre me ajudaram com uma palavra de incentivo, um colo ou uma demonstração de orgulho.

Ao professor Dr. Ricardo Ayub pela orientação e indicação do projeto, por confiar no meu empenho e acreditar no meu trabalho. Obrigada pela oportunidade de desenvolver um trabalho tão especial que tem me proporcionado um imenso aprendizado.

Ao professor Dr Rafael Mazer Etto pela co-orientação, sempre me ensinando a raciocinar e ter senso crítico sobre o que está sendo executado, contribuindo muito para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Obrigada por sempre disponibilizar seu tempo para me ajudar a resolver problemas e por sempre me aconselhar e me incentivar de forma tão serena.

À professora Dra. Carolina Galvão não apenas pelas muitas contribuições relacionadas ao projeto de pesquisa, mas também e principalmente pelo apoio emocional, agindo sempre como uma mãe e amiga, não apenas para mim, mas também para os demais colegas de laboratório, mantendo a harmonia e o trabalho em equipe sempre em alta.

À técnica de laboratório Ligia Dambroski dos Santos por estar sempre presente e disposta a ajudar, mantendo a organização e limpeza dos materiais e ambiente de trabalho. Também por ser esta pessoa tão amável, que está sempre sorrindo e mostrando o lado bom das coisas. Obrigada por perceber meus momentos de fraqueza e me amparar com seu colo de mãe.

Aos amigos, muito mais que apenas colegas de laboratório, Silvia Albuquerque, Luane Bosetto, Rafaela Furmam, Aline Margraf, Barbara Fidelis Schneider, Venícios Gabre, Daiane Barreto, Fernanda Furmam, Fernanda Silva, Satomi Hirooka, Jessé Neves dos Santos, Marília Stroka, Ana Paula de Azevedo Pasqualin, Gabrielle Silveira de Campos e Precila Zambotto Lopes pelo apoio, carinho, companheirismo, imensa ajuda prática em inúmeras etapas do trabalho, por me ouvirem desabafar ou simplesmente raciocinar em voz alta apenas para saber se o que eu dizia fazia sentido. Obrigada por se preocuparem comigo. À vocês meus amigos eu agradeço também pelo ambiente maravilhoso de trabalho, repleto de cooperação, harmonia e aconchego.

À todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, acrescentando mais um tijolinho na minha construção pessoal.

**“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”**

(Charles Chaplin)

RESUMO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma cultura de elevado valor comercial e de expressiva produção mundial. Os frutos verdadeiros do morangueiro são secos e chamados de aquênios enquanto que a porção carnosa e comestível na verdade se trata do receptáculo floral desenvolvido. Este conjunto de aquênio e receptáculo apresenta padrão de maturação de frutos não-climatéricos, caracterizado por não apresentar um pico de respiração e produção de etileno durante o processo de maturação e também, por não serem capazes de completar a maturação após a colheita. Devido o pequeno tamanho da planta, rápida propagação e produção de frutos, o morangueiro se tornou planta modelo nos estudos sobre a maturação de frutos não-climatéricos, principalmente no que se refere ao papel do etileno neste processo. Estudos voltados à maturação de frutos revelaram a existência de uma família de receptores proteicos responsável pela percepção do etileno em plantas. Em morangueiro, foram identificadas até o momento três sequências de genes de receptores de etileno, divididos em duas subfamílias (*FaETR1* e *FaERS1* – Subfamília I e *FaERS2* – Subfamília II). Dentre estes genes, baseados na literatura, acreditamos que o gene *FaETR1*, membro da subfamília I dos receptores de etileno, possa desenvolver um papel superior aos demais no controle da percepção e transdução de sinal do etileno. No intuito de avaliar o envolvimento do receptor de etileno *FaETR1* na maturação do morangueiro e visando o entendimento da relação entre etileno e maturação de frutos não-climatéricos, buscamos o silenciamento deste gene em específico. Para tanto, o objetivo deste trabalho foi a construção em plasmídeo binário de uma estrutura em formato de grampo (hpRNA) que induza a ativação do sistema de RNA de interferência (RNAi) sobre a tradução do gene *FaETR1* em proteína receptora de etileno. Além disso, sabendo da importância de um apropriado método de regeneração e seleção de plantas transformadas, buscamos também desenvolver protocolo de regeneração *in vitro* de plantas de morangueiro das cultivares Camião Real e Festival, bem como, avaliar a sensibilidade destas plantas aos agentes seletivos canamicina (antibiótico) e glufosinato de amônia (herbicida) cujos genes estão presentes nos vetores de clonagem pCAMBIA3301 e pCAMBIA2301 utilizados neste trabalho.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*; Silenciamento Gênico; Organogênese e Cultura de Tecidos.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a high commercial value culture and show a significant world production. The true fruits of the strawberry are dry and called achenes while the fleshy and edible portion actually it is the floral receptacle developed. This set of achene and receptacle features the non-climacteric fruit pattern ripening, characterized by not show a peak respiration and ethylene production during the ripening process and also for this fruits not being able to complete the ripening after harvesting. Due to the small size of the plant, rapid propagation and production of fruit, the strawberry became the model plant in studies of non- climacteric fruit ripening, particularly with regard to the ethylene role in this process. Fruit ripening the focused studies have revealed the existence of a family of protein receptors responsible for the plant ethylene perception. In strawberry, have been identified so far three ethylene receptors genes sequences, divided into two subfamilies (*FaETR1* and *FaERS1* - subfamily I and *FaERS2* - subfamily II). Among these genes, based on the literature, we believe that *FaETR1* gene, a member of the ethylene receptors subfamily I, can develop a greater role to the other receptors in the control of perception and ethylene signal transduction. To assess the involvement of *FaETR1* ethylene receptor in the strawberry ripening and toward an understanding of the relationship between ethylene and non-climacteric fruits ripening, we seek the silencing of this particular gene. Thus, the objective of this work was the construction of a binary plasmid structure in hairpin format (hpRNA) that induces the activation of RNA interference system (RNAi) on the translation of *FaETR1* gene in ethylene receptor protein. Also, knowing the importance of an appropriate regeneration an plant transformed selection method, we seek also develop a proper *in vitro* regeneration protocol of Camino Real and Festival strawberries cultivar, as well as to assess the sensitivity of these plants to kanamycin (antibiotic) and glufosinate ammonium (herbicide) selective agents, whose genes are present in pCAMBIA 3301 and pCAMBIA2301 cloning vectors used in this study.

Keywords: *Fragaria x ananassa*; Gene silencing; Organogenesis and Tissue Culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota biossintética do etileno.....	19
Figura 2. Estrutura das diferentes isoformas de receptores de etileno identificados em <i>A. thaliana</i>	22
Figura 3. Modelo para a transdução de sinal de etileno em <i>A. thaliana</i>	23
Figura 4. Modelo de sobreposição funcional dos receptores de etileno da subfamília I, principalmente do receptor ETR1.....	24
Figura 5. Modelo de vias de interferência de RNA.....	28
Figura 6. Eficiência da indução de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) por diferentes construções genéticas e a estrutura prevista de RNA transcrito.....	29
Figura 7. Construção de hpRNA com sequências alvo repetidas em sentidos opostos e separadas por uma sequência não complementar.....	30
Figura 8. Sequencia EST do gene <i>FaETRI</i> disponível no banco de genes NCBI (do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>) com número de acesso AJ297511.1.....	44
Figura 9. Amplificação dos fragmentos auto complementares <i>sense</i> e <i>antisense</i>	45
Figura 10. Placa de Petri contendo colônias de <i>E. coli</i> DH10B eletrotransformadas.	46
Figura 11. Confirmação da clonagem dos fragmentos <i>sense</i> (380pb) e <i>antisense</i> (351pb) no plasmídeo pGEM-T <i>Easy</i> por reação de PCR.....	47
Figura 12. Confirmação da clonagem dos fragmentos <i>sense</i> (380pb) e <i>antisense</i> (351pb) no plasmídeo pGEM-T <i>Easy</i> por liberação das sequência por enzimas de restrição.....	48
Figura 13. Confirmação da clonagem do fragmento <i>antisense</i> (351pb) no plasmídeo pKANNIBAL por PCR.	49
Figura 14. Confirmação da clonagem dos fragmentos <i>antisense</i> (351pb) e <i>sense</i> (380pb) no plasmídeo pKANNIBAL por PCR.	50
Figura 15. Confirmação da clonagem dos fragmentos <i>antisense</i> (351pb) e <i>sense</i> (380pb) no plasmídeo pKANNIBAL por comparação de tamanho das sequências linearizadas.	51
Figura 16. Representação esquemática da construção do cassete de expressão do hpRNA previsto para agir inibindo a tradução do gene <i>FaETRI</i> em proteína receptora de etileno.....	51

Figura 17. Explantes peciolares de morangueiro com formação de broto quimérico, sem forma definida de folhas e pecíolos (A) e formação de calos, em pequena quantidade e apenas na região do corte (B). Explante foliar com regeneração de brotos completos capazes de regenerar uma nova planta de morangueiro (C).....	59
Figura 18. Explantes foliares de morangueiro submetidos à concentrações crescente (0, 10, 20, 30, 40 e 50mg\L) de canamicina.....	62
Figura 19. Explantes foliares de morangueiro da cultivar Festival submetidos à concentrações crescente (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5mg\L) de glufosinato de amônia.....	64
Figura 20. Mapa de restrição do plasmídeo de clonagem pGEM-T <i>Easy</i>	74
Figura 21. Mapa de restrição do plasmídeo de construção pKANNIBAL.....	74
Figura 22. Mapa de restrição do plasmídeo Binário pCAMBIA 3301.....	75
Figura 22. Mapa de restrição do plasmídeo Binário pCAMBIA 2301.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequencias de <i>primers</i> desenhados para a amplificação dos fragmentos desejados (<i>sense</i> e <i>antisense</i>) referentes a uma região específica do gene <i>FaETR1</i> de <i>Fragária ananassa</i> proposta para agir como potencial RNAi. Regiões sublinhadas indicam o sítio de restrição das enzimas ao lado referidas.....	38
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	38
Tabela 3. Número de gemas e brotos obtidos por organogênese de explante foliar de morangueiro “Camiño Real” a partir de diferentes combinações de TDZ e AIB. (Ponta Grossa, 2013).....	60
Tabela 4. Número de gemas e brotos obtidos por organogênese de explante foliar de morangueiro “Festival” a partir de diferentes combinações de TDZ e AIB. (Ponta Grossa, 2013).....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. A - Número de gemas e brotos obtidos em explante foliar de morangueiro “Camiño Real”, submetidos a concentrações crescentes do antibiótico canamicina. B - Número de gemas e brotos obtidos em explante foliar de morangueiro “Festival”, submetidos a concentrações crescentes do antibiótico canamicina. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	63
---	----

Gráfico 2. Número de brotos obtidos em explante foliar de morangueiro “Festival”, submetidos a concentrações crescentes de glufosinato de amônio aplicado a partir do herbicida Finale®. (Ponta Grossa, 2014).....65

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB	ácido indolbutírico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
CTR1	do inglês, <i>Constitutive Triple Response</i>
dsRNA	do inglês, <i>double strand RNA</i>
DCLs	do inglês, <i>Dicer Like</i>
EIN4	do inglês, <i>Ethylene Insensitive 4</i>
EIN2	do inglês, <i>Ethylene Insensitive 2</i>
EIN3	do inglês, <i>Ethylene Insensitive 3</i>
ERS1	do inglês, <i>Ethylene Response Sensor 1</i>
ERS2	do inglês, <i>Ethylene Response Sensor 2</i>
ERF	do inglês, <i>Ethylene Responsive Factor</i>
ETR1	do inglês, <i>Ethylene Receptor 1</i>
ETR2	do inglês, <i>Ethylene Receptor 2</i>
etr1-1	Mutante com perda de função do receptor de etileno ETR1
GAF	do inglês: cGMP-specific phosphodiesterases, Adenylyl cyclases and FhlA
hpRNA	do inglês, <i>hairpinRNA</i>
miRNP	do inglês, <i>ribonucleoprotein complex</i>
miRNAs	do inglês, <i>micro RNAs</i>
mRNA	RNA mensageiro
MTA	5'- Methylthioadenosine
1-MCP	1-Metilciclopropeno
PGR	do inglês <i>Plant Growth Regulator</i>
PGTS	do inglês, <i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>
RISC	do inglês, <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi,	RNA de interferência
SAM	S-adenosilmetionina
siRNAs	do inglês, <i>short interfering RNA</i>
TDZ	Thidiazuron
TGS	do inglês, <i>Transcriptional Gene Silencing</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 ETILENO E O AMADURECIMENTO DOS FRUTOS.....	18
2.2 PERCEPÇÃO, REGULAÇÃO E TRANSDUÇÃO DE SINAL.....	20
2.3 MORANGO COMO MODELO DE ESTUDO.....	25
2.4 SILENCIAMENTO GENICO PÓS-TRANSCRICIONAL.....	26
2.5 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS.....	30

CAPITULO I – Construção de Cassete de Expressão para Silenciamento Genico Pós-transcricional via RNA de Interferência do Gene Receptor de Etileno *FaETR1* em Morangueiro comercial (*Fragaria x ananassa*).

RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1 Construção de <i>primers</i> específicos e isolamento dos fragmentos do gene <i>FaETR1</i>	37
2.2 Amplificação dos fragmentos <i>sense</i> e <i>antisense</i> do gene <i>FaETR1</i> e clonagem no vetor pGEM-T <i>Easy</i>	39
2.3 Preparo de <i>Escherichia coli</i> DH10B eletrocompetente.....	40
2.4 Eletroporação em <i>E. coli</i> DH10B.....	40
2.5 Análise das <i>E. coli</i> DH10B transformadas.....	41
2.6 Clonagem dos fragmentos <i>sense</i> e <i>antisense</i> vetor pKANNIBAL.....	41
2.7 Clonagem nos vetores pCAMBIA 3301 e pCAMBIA 2301.....	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4. CONCLUSÕES.....	51
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	52

CAPITULO II – Estabelecimento de um Eficiente Sistema de Regeneração e Determinação da Sensibilidade aos Agentes Seletivos Canamicina e Glufosinato de Amônio para as Cultivares Camião Real e Festival de *Fragaria x ananassa*.

RESUMO.....	53
ABSTRACT.....	54

6. INTRODUÇÃO.....	55
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
7.1 Experimento I –Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e Ácido Indolbutírico (AIB) na organogenese de plantas de morangueiro a partir de explantes foliares e peciolares.....	57
7.2 Experimento II - Sensibilidade da organogenese foliar do morangueiro aos agentes seletivos Canamicina e Glufosinato de amônia.....	58
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
9. CONCLUSÕES.....	65
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O morangueiro comercial (*Fragaria x ananassa*) é um híbrido octaplóide originado do cruzamento natural entre os octaplóides selvagens *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloensis*, ocorrido à aproximadamente 250 anos (Revisado por Hancock et al., 2010). Considerado um pseudofruto, o morango que consumimos é composto pelo receptáculo floral desenvolvido (porção carnosa) e aquênios secos (frutos verdadeiros), sendo altamente valorizado como cultura e apreciado pelo sabor e qualidade nutritiva (SONG et al., 2009).

A produção mundial de morango está centrada nas Américas (38%) e na Europa (37%), e vem crescendo nos últimos anos, chegando em 2011 a 4,6 milhões de toneladas em 244 mil hectares cultivados. Os Estados Unidos destaca-se como maior produtor mundial com aproximadamente 1,3 milhões de toneladas correspondentes à 29% da produção mundial. Em segundo lugar encontra-se a Espanha com aproximadamente 505 mil toneladas, o que representa aproximadamente 11% da produção mundial de morango. Já o Brasil, embora contribua com menos de 1% da produção mundial, tem apresentado aumento significativo na produção de morango. Em 1996, a produção brasileira ficava em torno de 37,5 mil toneladas e em 2006 este valor subiu para aproximadamente 100 mil toneladas. Atualmente o país se destaca como principal produtor de morangos da América do Sul com 100 mil toneladas em uma área de aproximadamente 3,7 mil hectares (FAO 2011).

Os morangos são ricos em ácido ascórbico e metabólitos secundários e no Brasil o mercado da fruta fresca representa em torno de 90% do destino da produção (ANTUNES; REISSER, 2007), entretanto, como nas demais regiões produtoras do mundo, a cultura do morangueiro enfrenta problemas na comercialização devido a elevada taxa de amolecimento da polpa ao longo da maturação (BAPAT et al., 2010).

Com relação à maturação, os frutos carnosos são classificados em climatéricos e não-climatéricos de acordo com o padrão respiratório e produção de etileno. Os frutos do morangueiro apresentam padrão de maturação não-climatérica caracterizado por não apresentar um pico de respiração e produção de etileno durante este processo, e também, por não serem capazes de completar a maturação após a colheita, já que seu ponto de maturação fisiológica coincide com o ponto de colheita. Assim, uma colheita precoce, com a intensão de reduzir a sensibilidade do produto à perdas pós-colheita, acaba por impossibilitar estes frutos de completarem o desenvolvimento de fatores atrativos e nutricionais após a colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Já em frutos climatéricos como a banana, o ponto de maturação fisiológica ocorre antes do ponto de colheita, possibilitando a colheita de frutos

aparentemente imaturos que já atingiram o ponto de maturação fisiológica e que, portanto, conseguem completar o desenvolvimento de fatores atrativos e nutricionais mesmo após a colheita (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Em frutos climatéricos, o hormônio vegetal etileno é considerado a principal molécula de sinalização, responsável por controlar os aspectos de maturação do fruto. Em contrapartida, no amadurecimento dos frutos não-climatéricos, embora existam eventos dependentes do etileno, o papel deste regulador ainda não foi completamente elucidado, sugerindo que o processo de maturação destes frutos não seja controlado apenas pelo etileno (PECH et al., 2012).

Através do conhecimento dos mecanismos que envolvem a maturação dos frutos climatéricos foi possível desenvolver técnicas de armazenamento como resfriamento, atmosfera modificada e atmosfera controlada. Além disso, a partir do entendimento do metabolismo da maturação de frutos, surgiram produtos comerciais como 1-MCP (1-Metilciclopropeno), AVG (Aminoethoxy vinyl glycine) e STS (Tiosulfato de Prata). Estes produtos agem sobre a percepção e produção de etileno, retardando a maturação e possibilitando o manejo em favorecimento da conservação pós-colheita. Da mesma forma, um maior entendimento dos fatores que desencadeiam a maturação de frutos não-climatéricos possibilitaria o desenvolvimento de técnicas e produtos que aumentem a vida de prateleira, melhorem a qualidade e reduzam as perdas pós-colheita destes frutos.

Recentemente estudos sobre a percepção de etileno em frutos não-climatéricos, utilizando o morangueiro como planta modelo, identificaram três proteínas receptoras de etileno sendo elas *FaETR1*, *FaERS* e *FaETR2* (TRAINOTTI et al., 2005). Posteriormente, Merchante et al. (2013) obteve plantas de morangueiro transgênico com perda de função da proteína receptora *FaETR1*, e observou alterações no processo de maturação destes frutos, levando a crer que em morango, este receptor desempenha um papel bastante pronunciado na percepção de etileno.

Todavia, sabendo que a sinalização do etileno depende de uma interação do receptor de etileno com uma proteína reguladora negativa do sinal (CTR1), e que recentemente tem sido proposto uma rota direta de transdução de sinal, dependente apenas do receptor proteico (ZHANG et al., 2014), seria interessante uma planta modelo ausente de um ou mais receptores, e não apenas com perdas de função pontuais, possibilitando assim, estudar a via de transdução de sinal e a interação entre receptores, além do papel do etileno na maturação de frutas de morango.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi construir um plasmídeo binário capaz de gerar uma estrutura em formato de grampo (hpRNA) e ativar o sistema natural de RNA de interferência (RNAi), buscando a inibição da tradução do gene *FaETR1* que codifica em proteína receptora de etileno. Assim, a partir desta estratégia será possível futuramente a obtenção de plantas transgênicas de morangueiro que poderão servir de modelo de estudo para o entendimento dos mecanismos que envolvem a maturação dos frutos não-climatéricos, o papel de etileno neste processo, as interações que ocorrem entre receptores e a via de sinalização do etileno. Para tanto, outro objetivo deste trabalho foi avaliar a organogênese de plantas de morangueiro das cultivares ‘Camiño Real’ e ‘Festival’, e a sensibilidade destas plantas aos agentes de seleção canamicina (antibiótico) e glufosinato de amônia (herbicida), cujos genes estão presentes nos vetores de clonagem pCAMBIA3301 e pCAMBIA2301 utilizados neste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETILENO E O AMADURECIMENTO DOS FRUTOS

Considerado o único regulador vegetal gasoso, o etileno (C_2H_4) é um hidrocarboneto insaturado que apresenta uma das mais simples moléculas orgânicas com atividade biológica (ZHU; GUO, 2008). Embora conhecido como “hormônio do amadurecimento” pelo seu papel bastante elucidado em frutos climatéricos (GIOVANONI, 2001; BAPAT et al., 2010), também está envolvido em uma série de outros aspectos do crescimento e do desenvolvimento das plantas, como germinação de sementes, alongação celular, iniciação radicular, desenvolvimento e determinação sexual de flores, senescência e regulação do estresse vegetal (HALL et al., 2012; MERCHANTE et al., 2013). Produzido por todas as partes da planta, sua concentração tende a variar de acordo com o tecido e o estágio de desenvolvimento, podendo ser aumentada por ferimentos, maturação (frutos climatéricos), senescência e abscisão (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

No que se refere à maturação de frutos, o etileno está envolvido em uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas que resultam em alterações na textura, cor, aroma e sabor (SYMONS et al., 2012; BAPAT et al., 2010) e de acordo com o padrão de produção de etileno, os frutos podem ser classificados em climatéricos ou não-climatéricos.

No que diz respeito a biossíntese de etileno, dois sistemas distintos tem sido descritos. O sistema 1, também chamado de via direta de produção de etileno, é comum em frutos climatéricos e não-climatéricos, bem como em outras partes das plantas em crescimento e desenvolvimento e também em resposta a estresses. Neste sistema a Metionina é convertida

em SAM (S-adenosilmetionina) para a síntese de ACC pela enzima ACC sintase, que por final é oxidado em etileno pela enzima ACC oxidase. Já no sistema 2, presente apenas em frutos climatéricos, a biossíntese do etileno inicia na rota autocatalítica (ciclo de Yang), onde a Metionina é convertida em SAM (S-adenosilmetionina) e posteriormente dividida em MTA (5'- Methylthioadenosine) para a manutenção do ciclo, e em ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) para a via direta de produção de etileno (BAPAT et al., 2010; SINHA et al., 2012) (Figura 1).

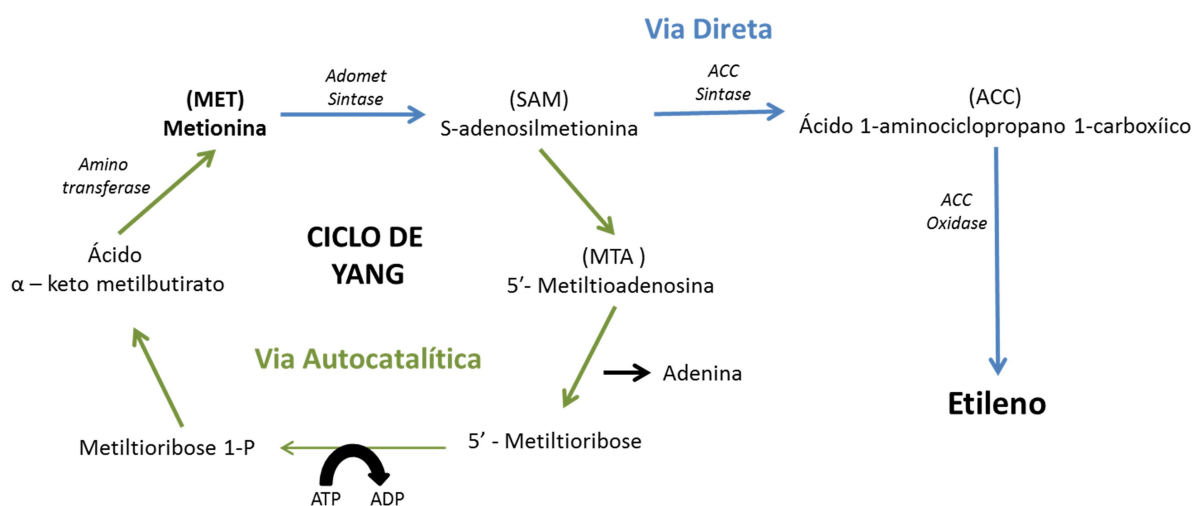


Figura 1. Rota biossintética do etileno. A via autocatalítica (Ciclo de Yang) exclusiva de frutos climatéricos está representada pelas setas verdes e a via direta, presente também em frutos não-climatéricos está representada pelas setas azuis (Adaptado de BAPAT et al., 2010).

Nestes frutos climatéricos, antes da fase de amadurecimento ocorre um aumento característico da respiração precedido por um pico de produção de etileno, devido à formação adicional de etileno pela via autocatalítica (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Assim estes frutos quando imaturos e tratados com etileno têm o início do climatério acelerado pela produção autocatalítica e atingem a maturação mesmo após a colheita.

Em frutos de tomate, por exemplo, a aplicação exógena de etileno acelera a produção de caroteno e licopeno, responsáveis pela coloração do fruto, além de induzirem a ação de um conjunto de enzimas como poligalacturonases e β -glucanases, responsáveis pelo amaciamento da polpa (GIOVANNONI, 2001).

Já em frutos não-climatéricos a Metionina é convertida em SAM (S-adenosilmetionina) e em seguida em ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) para a via direta de produção de etileno, não havendo produção autocatalítica, resultando em produção endógena bastante reduzida e não havendo picos de respiração e produção de etileno durante o amadurecimento (SINHA et al., 2012). Desta forma, mesmo a aplicação exógena de

etileno não resulta em produção autocatalítica, nem acelera o amadurecimento e estes frutos. Assim, frutos não-climatéricos colhidos antes do ponto de maturação, não são capazes de atingir a maturação após a colheita mesmo sob aplicações exógenas de etileno (BARRY; GIOVANNONI, 2007; MERCHANTE et al., 2013).

Entretanto, estudos recentes em frutos não-climatéricos relatam que aplicações exógenas de etileno em frutos de morango no estágio de desenvolvimento de “frutos brancos”, aumentam a biossíntese de antocianinas, responsáveis pela coloração do fruto, e a atividade das enzimas do conjunto das poligalacturonases, envolvidas no processo de amaciamento da polpa, enquanto que a aplicação de 1-MCP, um inibidor de etileno que age sobre os receptores de etileno, traz respostas contrárias inibindo o processo de amadurecimento (VILLARREAL et al., 2010). Assim, pode se dizer que embora o etileno não seja o único regulador do crescimento vegetal (PGR - do inglês *Plant Growth Regulator*) envolvido na regulação da maturação de frutos não-climatéricos, a produção de pequenas quantidades é suficiente e também essencial para desencadear respostas fisiológicas relacionadas ao amadurecimento nestes frutos.

2.2 PERCEPÇÃO, REGULAÇÃO E TRANSDUÇÃO DE SINAL.

Para desencadear mudanças metabólicas como o amadurecimento de frutos, além da biossíntese do etileno, ainda são necessários mecanismos de percepção e transdução de sinal para a expressão de genes responsivos ao etileno (PECH et al., 2012). Em frutos carnosos, genes que codificam proteínas envolvidas na degradação da parede celular e na biossíntese de pigmentos foram os primeiros genes etileno-responsivos isolados (BAPAT et al., 2010).

Em determinado estágio da maturação, o etileno liga-se ao seu receptor proteico na célula, e regula a respiração, o desenvolvimento de cor, o aumento da maciez e dos açúcares solúveis, a redução da acidez, entre outros aspectos que caracterizam o amadurecimento e a senescência dos frutos (BARRY; GIOVANNONI, 2007).

Considerados elementos chave na modulação à resposta, os receptores de etileno foram os primeiros receptores hormonais identificados em plantas. Bleecker e colaboradores (1988) buscando mutantes de *Arabidopsis thaliana* com senescência retardada observaram que algumas plântulas germinavam e se desenvolviam normalmente na ausência de luz e pressão de etileno, não apresentando a típica “tríplice resposta” (encurtamento e engrossamento do hipocótilo, inibição do alongamento da raiz, e a formação de um exagerado gancho apical). Estes mutantes apresentavam perda de função de uma proteína identificada como receptor de etileno (ETR1 – do inglês, *Ethylene Receptor 1*) e serviram de modelo nos

estudos de percepção e transdução de sinal deste regulador (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007; LANCEY; BINDER, 2014).

Novos estudos identificaram em *A. thaliana* outras quatro isoformas de receptores chamados ETR2 (do inglês, *Ethylene Receptor 2*), ERS1 e ERS2 (do inglês, *Ethylene Response Sensor 1 and 2*) e EIN4 (do inglês, *Ethylene Insensitive 4*). A descoberta de outras proteínas receptoras de etileno, com características estruturais semelhantes (isoformas) indicou que a percepção de etileno não é feita de forma singular e sim de forma conjunta, por uma família de receptores. Todavia, o número de isoformas tende a variar de espécie para espécie, sendo, por exemplo, relatado a identificação até o momento de 6 isoformas receptoras de etileno em tomate, 5 em maçã, 4 em pêra, 3 em morango, 2 em melão e 1 em manga (Revisado por Contreras-Vergara et al., 2012).

As isoformas receptoras de etileno, embora variem em número de espécie para espécie, apresentam em comum uma estrutura modular global, contendo três ou quatro domínios transmembranas α -hélices com região conservada próximo às extremidades N-terminais que ao se ligarem a um co-factor de cobre formam o domínio de ligação do etileno. Na sequência os receptores de etileno apresentam um domínio GAF (do inglês: cGMP-specific phosphodiesterases, Adenyl cyclases and FhlA) que tem sido associado à interações proteína-proteína entre os receptores, entretanto, ainda é considerado de função pouco conhecida (GAO et al., 2008). E por fim, um domínio histidina cinase na metade C-terminal, responsável pela saída de sinal, podendo apresentar um domínio receptor, que serve como regulador de resposta (HALL et al., 2012; LACEY; BINDER, 2014).

De acordo com as suas características estruturais, os receptores de etileno são classificados em duas subfamílias. A subfamília I apresenta três domínios transmembranas e contém todos os resíduos de aminoácidos necessários para a atividade histidina cinase *in vitro*, enquanto que a subfamília II apresenta quatro domínios transmembrana e o domínio histidina cinase degenerado na região C-terminal, faltando um ou mais elementos considerados necessários para atividade histidina cinase e apresentando apenas atividade serina/treonina cinase *in vitro*. (SHAKEEL et al., 2012; LACEY; BINDER, 2014) (Figura 2). Embora a atividade histidina cinase não pareça ser necessária para as respostas ao etileno, esta pode ter um papel modulador na transdução de sinal do receptor (LACEY; BINDER, 2014).

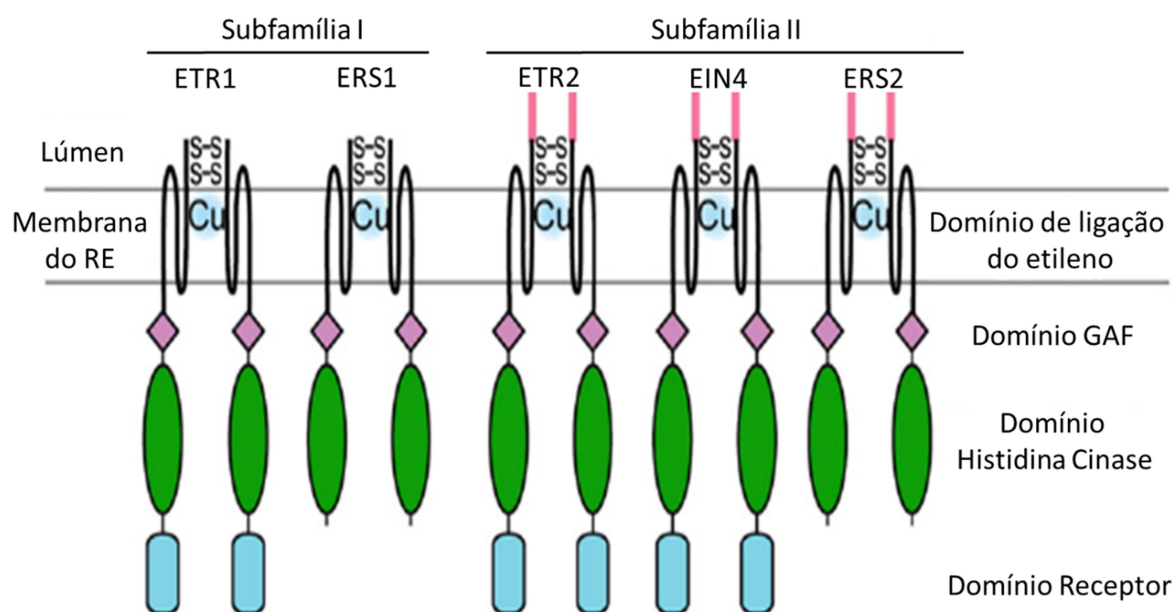


Figura 2. Estrutura das diferentes isoformas de receptores de etileno identificados em *A. thaliana*. Os receptores de etileno em plantas são homodímeros estabilizado por duas pontes dissulfeto presentes na membrana do Reticulo Endoplasmático (RE). Os receptores são divididos em duas subfamílias de acordo com características estruturais partilhadas. Cada monômero dos membros da subfamília I é composto por três domínios transmembranais α -hélices, seguido por um domínio GAF e um domínio cinase. Na subfamília II, a diferença está na presença de um quarto domínio transmembrana α -hélices, indicada pela porção rosa acima da ponte dissulfeto, seguido por um domínio GAF e um domínio cinase que neste caso é degenerado. Alguns receptores, independente da subfamília, também contêm um domínio chamado domínio receptor. As α -hélices do dímero formam o domínio de ligação de etileno na presença do íon cobre (Cu) (Adaptado de Lacey e Binder, 2014).

Em *A. thaliana* foi identificado que a expressão dos genes de resposta ao etileno é dependente da ligação do etileno ao receptor presente na membrana do retículo endoplasmático. Uma vez ligado, os receptores inativam a proteína cinase CTR1 (do inglês, *Constitutive Triple Response*), que torna-se incapaz de fosforilar e inativar a proteína EIN2 (do inglês, *Ethylene Insensitive 2*). A proteína EIN2 ativada libera seu domínio C-terminal para o núcleo e ativa os fatores de transcrição EIN3 (do inglês, *Ethylene Insensitive 3*), EIL (EIN3-like) e ERF (do inglês, *Ethylene Responsive Factor*) (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007) (Figura 3A), responsáveis pela ativação dos genes envolvidos no desenvolvimento de cor, aumento da maciez e açúcares solúveis e redução da acidez, entre outros aspectos que caracterizam o amadurecimento e a senescência dos frutos carnosos (BARRY; GIOVANNONI, 2007). Na ausência de etileno os receptores não inativam a proteína cinase CTR1, que por consequência fosforila a proteína EIN2, inativando-a (Figura 3B). Desta forma a proteína EIN2 não consegue ativar os fatores de transcrição envolvidos na

resposta ao etileno (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). Embora esta via já esteja bem descrita já existem relatos caminhos alternativos para sinalização de etileno não envolvendo CTR1 e tendo o sinal de saída coordenado pelas porções N e C-terminal dos próprios receptores (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007; ZHANG et al., 2014) (Figura 3).

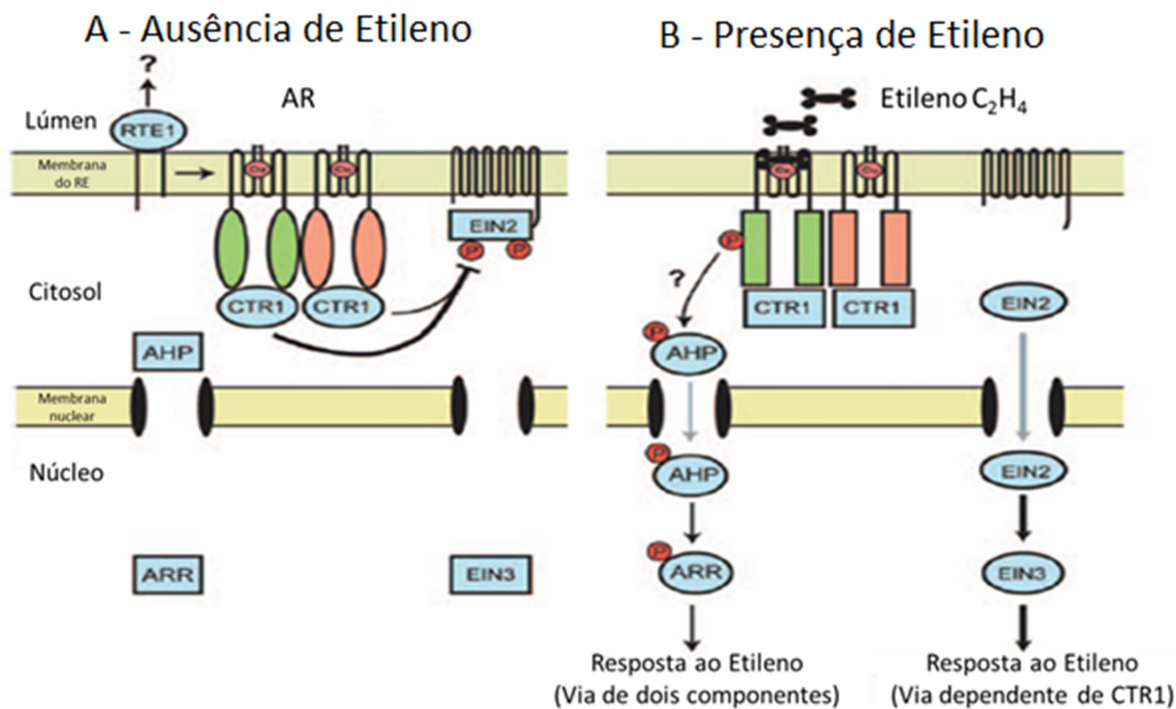


Figura 3. Modelo atual de transdução de sinal de etileno em *A. thaliana* via CTR1-dependente. A- Na ausência de etileno, CTR1 ativada fosforila e inibe EIN2. B- Na presença de etileno, os receptores de etileno inativam CTR1, e EIN2 desfosforilado libera seu domínio C-terminal para o núcleo e ativa fatores de transcrição como EIN3, resultando em resposta ao etileno. Outro potencial caminho alternativo para sinalização de etileno também está retratado indicado por '?'. Esta via de sinalização é supostamente iniciada pelos receptores da subfamília I e sugere que as proteínas phosphotransfer (AHP) e os reguladores de resposta (ARR) podem mediar um subconjunto das respostas ao etileno. Os círculos indicam formas ativas das proteínas e retângulos indicam formas inativas. A espessura das setas indicam as contribuições relativas para a resposta ao etileno. Setas cinzas indicam translocação a partir do citosol para o núcleo das proteínas indicadas (SHAKEEL et al., 2013).

Considerando que o sinal de saída pode ser parcialmente dependente do receptor que CTR1 está interagindo, alguns autores sugerem uma sobreposição funcional entre os receptores, em que receptores de etileno da subfamília-I parecem apresentar maior sensibilidade, provavelmente porque possuem o domínio histidina cinase conservado (HALL et al., 2007; HALL et al., 2012) (Figura 4). Em *A. thaliana* a perda de função de todos os receptores da subfamília-II manteve a sensibilidade da planta ao etileno enquanto que a perda de função de apenas um receptor da subfamília I produziu plantas insensíveis ao etileno

(CANCEL; LARCEN, 2002). A insensibilidade ao etileno ocorreu provavelmente porque a perda da função do receptor da subfamília-I deixou a proteína cinase CTR1 ativada, mesmo na presença de etileno, e assim, EIN2 foi constantemente inativado por fosforilação, não ativando os genes de resposta ao etileno (HALL et al., 2007). O que não se sabe ao certo ainda é se a presença de CTR1 está ligada a presença do seu respectivo receptor ou não, já que os trabalhos até o momento relatam apenas a perda de função e não a inibição da tradução do gene do receptor em proteína receptora.

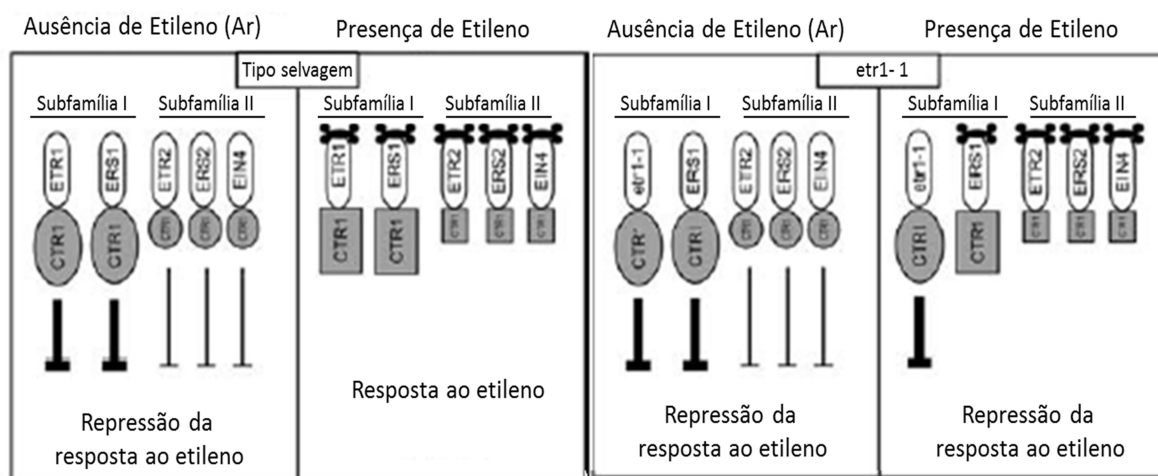


Figura 4. Modelo de sobreposição funcional dos receptores de etileno da subfamília I, principalmente do receptor ETR1. Na ausência de etileno, todos os receptores interagem com CTR1, entretanto com maior expressão dos receptores da subfamília-I. A ligação do etileno nos receptores resulta na inativação de CTR1 e acarreta em resposta ao etileno. Na figura, CTR1 ativo é indicado por um círculo e inativo por um quadrado; o tamanho do símbolo de CTR1 indica sua contribuição à sinalização. Na perda de receptores da subfamília-I no mutante *etr1-1*, já não podendo ligar-se ao etileno, este receptor continua a ativar CTR1, e devido sua maior capacidade de ativar este regulador negativo, consegue sozinho reprimir a sinalização (Adaptado de Hall et al., 2007)

Diferente de CTR1, que age regulando negativamente à resposta ao etileno, a proteína EIN2 age como um regulador positivo na transdução deste sinal. Localizado na membrana do retículo endoplasmático, próximo aos receptores de etileno (WEN et al., 2012) esta proteína integral de membrana possui 12 domínios α -hélices com uma região N-terminal semelhante à de transportadores de íons Nrap e domínio C-terminal hidrofílico que se acredita ser citosólico (JU et al., 2012). Segundo Bisson et al. (2009), EIN2 é o único gene de todos os componentes envolvidos na via de etileno cuja mutação de perda de função pode levar à completa insensibilidade ao etileno, entretanto para a cultura do morangueiro (*Fragaria*

ananassa) não possui até o momento nenhuma sequência desse gene depositada em banco de dados.

2.3 MORANGUEIRO COMO MODELO DE MATURAÇÃO DOS FRUTOS NÃO-CLIMATÉRICOS

Dentre os frutos não-climatéricos, o morango é o sistema mais estudado para entendimento do papel do etileno na regulação da maturação (GIOVANNONI, 2001) devido ao seu pequeno tamanho, aos estádios de desenvolvimento bem definidos, a facilidade de propagação, ao curto estágio vegetativo e ao rápido desenvolvimento dos frutos (aproximadamente 30 dias do florescimento à maturação) (SYMONS et al., 2012). Além disso, vários genes relacionados com a maturação, que afetam o metabolismo da parede celular, cor e aroma já foram caracterizados (Revisado por GIOVANNONI, 2004). Entretanto, comparado ao conhecimento que se tem a respeito dos mecanismos que regulam a maturação de frutos climatéricos, onde o etileno é o grande responsável por este processo, em frutos não-climatéricos, como o morango, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que regulam o seu amadurecimento (VILLARREAL et al., 2010).

Embora classificado como fruto não-climatérico devido a sua baixa produção endógena de etileno e a sua incapacidade de acelerar o amadurecimento com aplicações externas, estudos recentes tem gerado controvérsias sobre o papel do etileno no amadurecimento de frutos de morango. Apesar de sua baixa concentração, a produção de etileno em morango apresenta um padrão característico durante as diferentes etapas de desenvolvimento, sendo relativamente alta em frutos verdes, diminuindo em frutos brancos e novamente aumentando na fase de frutos vermelhos, sendo esta última etapa ainda acompanhada por um incremento na taxa de respiração, semelhante ao que acontece em frutos climatéricos no início da maturação (IANNETTA et al., 2006). Pode ser também observado um pico de produção dos receptores de etileno (*FaETR1* e *FaERS1*), e enzimas ligadas a biossíntese de etileno (*FaACO1* e *FaACO2*) no estágio rosa de maturação (TRAINOTTI et al., 2005). Além disso, a redução intencional de transcritos de *FaSAMS1*, envolvida na biossíntese de etileno, ou *FaCTR1* envolvida na transdução de sinal, pode retardar a coloração vermelha da fruta, e curiosamente, esta pode ser parcialmente resgatada pela aplicação de etileno na forma de ethephon (SUN et al., 2013). Desta forma, apesar destes frutos não apresentarem um pico de produção de etileno durante a maturação, ainda assim são capazes de sintetizar etileno em quantidades suficientes para desencadear o processo de amadurecimento (VILLARREAL et al., 2010) e responder à baixos níveis de etileno exógeno

(BAPAT et al., 2010), evidenciando que o etileno é uma molécula de sinalização necessária no amadurecimento de frutas de morango.

Entretanto, estes padrões irregulares de transcrição de genes ligados a biossíntese e a percepção de etileno, mostram que diferentemente dos frutos climatéricos, parece improvável que o controle de todo o processo de amadurecimento destes frutos dependa apenas de um único fator ou hormônio, e sim da interação entre múltiplos estímulos, muitos dos quais ainda precisam ser identificados (PECH, et al., 2012).

2.4 SILENCIAMENTO GENICO PÓS-TRANSCRICIONAL

O conhecimento da rota biossintética do etileno e as observações que o associavam à maturação de frutos (principalmente climatéricos), lavaram muitos pesquisadores a estudar o papel de etileno na regulação da maturação. Em particular, o uso da clonagem gênica possibilitou o desenvolvimento de plantas com regulação negativa de genes ligados ao etileno como os que codificam a ACC sintase em tomateiro (OELLER et al., 1991) e a ACC oxidase em meloeiro (AYUB et al., 1996) e tomateiro (HAMILTON et al., 1990). A inibição da expressão destes genes possibilitou o desenvolvimento de frutos com maturação retardada, reafirmando o papel do etileno na maturação de frutos climatéricos. Todavia, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que envolvem a maturação de frutos não-climatéricos, já que embora presente no processo de maturação, o etileno não é o único responsável por desencadear todo o mecanismo que acontece nos frutos climatéricos (TRAINOTTI et al., 2005; VILLARREAL et al., 2010; BAPAT et al., 2010; PECH et al., 2012; SYMONS et al., 2012; SUN et al., 2013; MERCHANTE et al., 2013)

A transformação genética de plantas é uma técnica que pode revolucionar a agricultura, melhorando o valor nutricional – arroz dourado (BYER et al., 2002), a adaptação das culturas a ambientes hostis – soja tolerante a seca (LEITE et al., 2014) e proporcionando resistência à doenças – Feijoeiro resistente ao mosaico dourado (BONFIM et al., 2007).

A clonagem gênica pode ser utilizada para inserir novos genes ou inativar genes específicos no genoma, permitindo o estudo de vias metabólicas específicas. Quando um novo gene é inserido, uma nova função é adicionada à planta transformada, como a resistência a herbicidas. Quando um gene é interrompido ou mesmo deletado, sua função é reduzida ou mesmo inativada. Uma forma de inativação gênica é o silenciamento do RNA promovendo a destruição do transcrito ou inibição da tradução em proteína (HARMOKO et al., 2013).

O silenciamento gênico por intermédio de RNA é um fenômeno natural característico de eucariotos que apresenta importante papel na regulação do desenvolvimento e na defesa

antiviral. O primeiro relato de silenciamento gênico por RNA foi publicado em 1928 observando plantas de tabaco infectadas nas folhas baixas com vírus *ring spot*, em que o restante da planta além de não apresentar sintomas, tornava-se imune a uma segunda infecção (BAULCOMBE, 2004).

Em plantas, naturalmente existem três rotas de silenciamento ao nível transcricional. As duas primeiras compreendem um silenciamento gênico pós-transcricional (PGTS - do inglês, *Post-Transcriptional Gene Silencing*). A primeira é mediada por pequenos RNAs de interferência (siRNAs - do inglês, *short interfering RNA*) de origem externa como por exemplo infecção por vírus ou inserção de gene exógeno. A segunda via envolve micro RNAs (miRNAs - do inglês, *micro RNAs*) de origem endógena gerados a partir da clivagem de RNAs dupla fita com complementariedade parcial, específicos dos genes alvos a serem regulados, comum na regulação da expressão gênica. E a terceira via, envolvendo o silenciamento gênico pré-transcricional (TGS - do inglês, *Transcriptional Gene Silencing*) mediante metilação de histonas e DNA e remodelando a cromatina (BAULCOMBE 2004; MATZKE et al., 2001; HARMOKO et al., 2013).

Nas duas primeiras vias, o RNA dupla fita (dsRNA - do inglês, *double strand RNA*), seja ele de origem endógena ou exógena é reconhecido por uma endonuclease tipo RNase III chamada Dicer para a clivagem em pequenos RNAs de interferência dupla fita (siRNAs de 21-22bp ou e miRNAs de 24-26bp). Os siRNAs e miRNAs são então metilados e incorporados aos complexos efetores RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) ou miRNP (do inglês, *ribonucleoprotein complex*) respectivamente. Os complexos efetores utilizam apenas a fita simples de RNA de sentido contrário (*antisenseRNA*) para se tornarem ativos. O RISC utiliza o *antisenseRNA* como uma sonda que hibridiza perfeitamente com o RNAm alvo e através da proteína Argonauta (componente catalítico) realiza a clivagem do RNAm alvo, impedindo sua tradução. Já o miRNP utiliza o *antisenseRNA* como sonda de complementariedade parcial ao mRNA alvo e inibe a síntese de proteínas por obstruir o caminho da polimerase (DYKXHOORN et al., 2003; WATSON et al., 2005; TANG et al., 2007; TIWARI et al., 2014) (Figura 5)

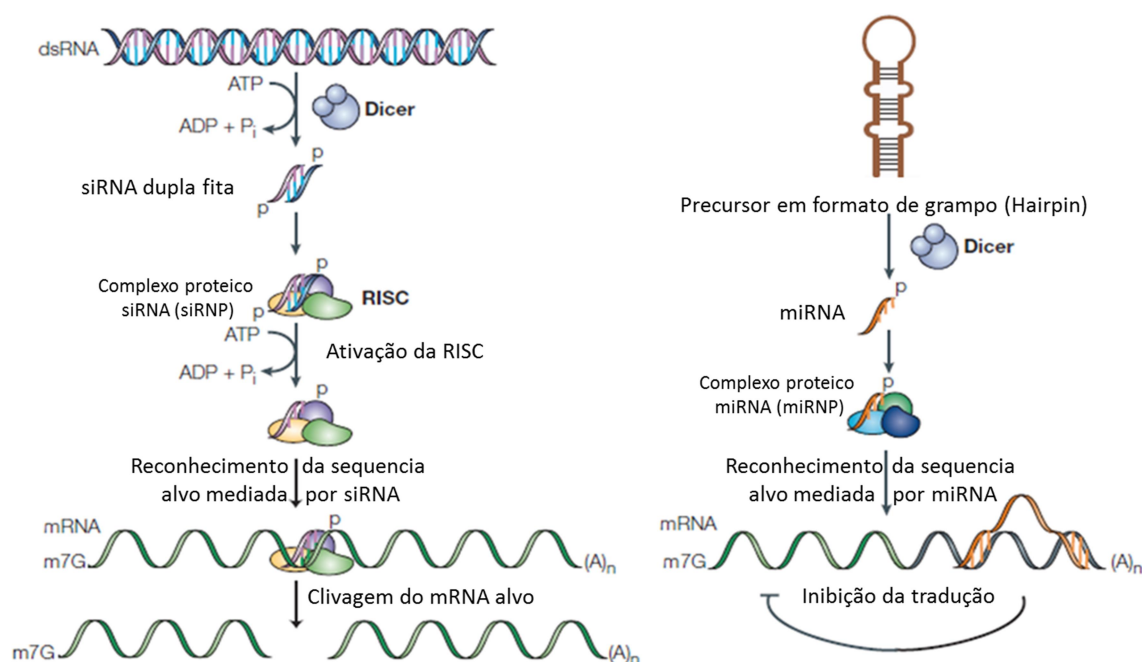


Figura 5. Modelo de interferência de RNA. O RNA dupla fita é clivada por uma RNase III, chamada Dicer, em pequenos (siRNAs) e micro RNAs (miRNAs). Os siRNAs (21-22 nucleotídeos) são incorporados no complexo de silenciamento (RISC) sem necessidade de ATP. Já no complexo a dupla fita é desenrolada com a necessidade de ATP, e a fita anti-sentido, complementar ao mRNA alvo, guia o complexo RISC e resulta em clivagem endonucleolítica impedindo a tradução. Diferentemente, os miRNAs (24-26 nucleotídeos) são fragmentos de cadeia simples, incorporados num complexo proteína-miRNA (miRNP), que através de uma complementariedade parcial com o RNAm alvo, inibe a tradução da proteína por obstruir o caminho da polimerase (DYKXHOORN et al., 2003).

Em plantas, a introdução de dsRNA sintético em células permite o silenciamento seletivo da expressão de genes alvos pela formação de sequências de siRNA (HELLIWELL; WATERHOUSE, 2003; TIWARI et al., 2014). Alguns estudos têm sistematicamente comparado diferentes estratégias de silenciamento gênico e relatam que a inserção direta de uma sequência de nucleotídeos com a capacidade de formar estrutura secundária de grampo (hpRNA – do inglês, *hairpinRNA*) apresenta maior eficiência de silenciamento que a inserção apenas de fragmentos de mesmo sentido (*senseRNA*) ou sentido contrário (*antisenseRNA*) ao gene alvo (SMITH et al., 2000) (Figura 6)

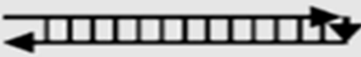
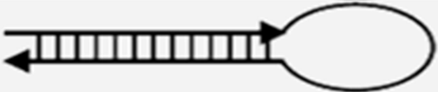
Construção	Estrutura prevista do transcrito de RNA	% PTGS
Sense		7
Antisense		4
hpRNA (intron loop)		96
hpRNA (spacer loop)		69

Figura 6. Eficiência da indução de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) por diferentes construções genéticas e a estrutura prevista de RNA transcrito. Nas estruturas previstas, setas apontando para a direita e apontando para a esquerda representam sequências simples em orientações sentido e antisense. As linhas verticais nas estruturas de hpRNA indicam a formação de RNA duplex. A pequena seta vertical representa a junção após o splicing que ocorre na construção com intron (hpRNA intron loop) e o balão representa o loop formado por uma sequência não complementar mas que não sofre splicing (Adaptado de Smith et al 2000)

A estrutura em forma de grampo (hpRNA) contém uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma região do gene alvo e também uma sequência complementar a esta mesma região do gene. Essas duas sequências ficam separadas por uma região não complementar. Após a transcrição as pontas complementares se hibridizam formando um hpRNA, e em seguida o hpRNA é clivado pela enzima Dicer produzindo vários pequenos RNAs (siRNAs), os quais inibem a tradução do RNAm complementar (TIWARI et al., 2014) (Figura 7).

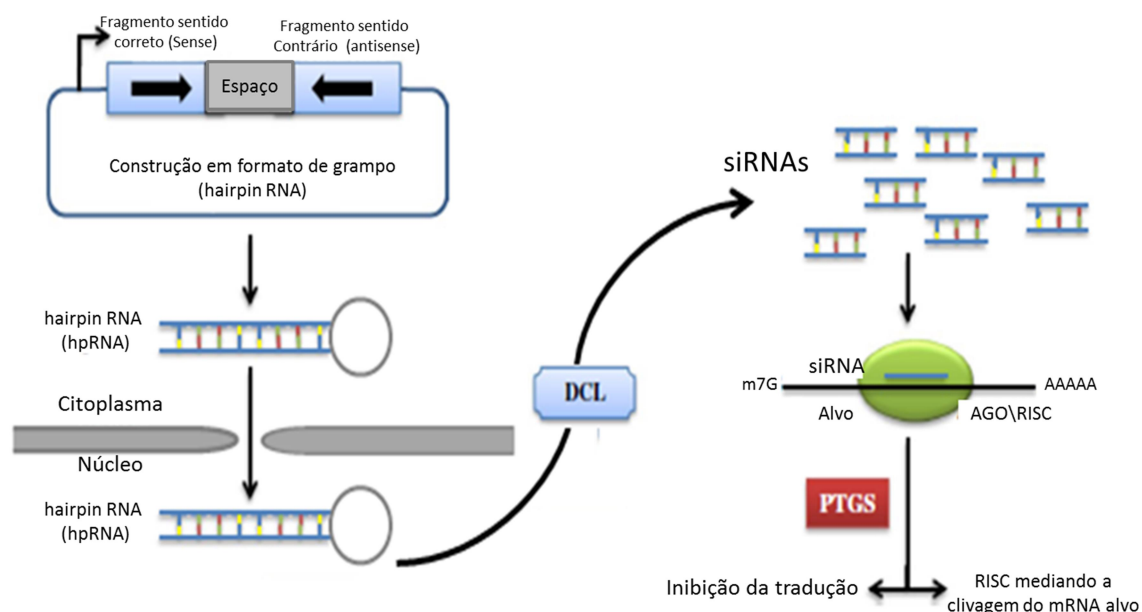


Figura 7. Construção de hpRNA com sequências alvo repetidas em sentidos opostos e separadas por uma sequência não complementar. Formado após a transcrição, a estrutura em formato de grampo é transformada no citoplasma em siRNAs pela ação da enzima Dicer (DCLs - do inglês, *Dicer Like*) e após a associação ao complexo RISC, realiza o silenciamento do gene alvo através da clivagem do RNAm e inibição da tradução (TIWARI et al., 2014).

2.5 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

Na cultura do morangueiro, bem como em muitas outras culturas, a susceptibilidade à infecção por espécies de *Agrobacterium tumefaciens* juntamente com a capacidade de regeneração *in vitro*, torna possível estudos de transformação genética via infecção por *A. tumefaciens*, de forma que esta técnica este se tornou o método mais utilizado e eficiente na obtenção de plantas de morangueiro geneticamente modificadas (JIMENEZ-BERMUDEZ et al., 2002; FOLTA; DHINGRA, 2006; ABADAL-AZIZ, 2006; DEBNATH; TEIXEIRA DA SILVA, 2007).

A transformação mediada por *Agrobacterium* envolve uma co-cultura da estirpe de *A. tumefaciens* contendo o vetor binário com o gene ou fragmento de gene de interesse, em contato com fragmentos da planta chamados de explantes que podem ser tecidos folhares, peciolares, cotilédones entre outros, para a infecção (FOLTA; DHINGRA, 2006; DEBNATH; TEIXEIRA DA SILVA, 2007).

Após a infecção por *A. tumefaciens*, o tecido transformado é submetido a um sistema de regeneração organogênica sobre um meio nutriente contendo um balanço hormonal entre auxina e citocinina. Baseada na totipotência das células vegetais este tecido deve ser capaz de

regenerar uma nova planta completa, sendo esta uma técnica viável e bastante utilizada na recuperação de plantas pós-infecção (BISWAS et al., 2010; QIN et al., 2011).

O processo organogenético está diretamente relacionado com o balanço de reguladores de crescimento exógenos utilizados, principalmente citocininas e auxinas (LEMOS, 2010). As citocininas são conhecidas por participar do controle do ciclo celular, estimular a divisão celular e a quebra de dormência de gemas laterais, enquanto que as auxinas influenciam no início da divisão celular, expansão celular e organização do meristema, promovendo a dominância apical. Logo, a modificação do balanço de citocinina/auxina endógeno através da presença destas no meio de cultura pode favorecer um padrão de desenvolvimento ou orientar uma organogênese desejável (GASPAR et al., 2003).

De acordo com Landi e Mazzetti (2006), plantas de morangueiro podem ser satisfatoriamente obtidas por organogênese a partir de determinações cuidadosas do balanço ideal de reguladores de crescimento no meio de regeneração, entretanto, isto é específico para cada cultivar, bem como para cada tecido utilizado como explante.

Todavia, além da regeneração, a identificação e seleção das plantas transformadas é de suma importância, considerando que a eficiência da transformação genética está associada ao sistema de seleção dos transformantes (SILVA et al., 2010). A inserção de genes marcadores que induzem à resistência á substâncias como antibióticos funciona como agente de seleção inibindo o desenvolvimento de brotos cuja transformação não foi eficiente (ABADAL-AZIZ, 2006; KARAMI et al., 2009; QIN et al., 2011).

Para a escolha do agente de seleção, além da disponibilidade deste em vetores de clonagem já existentes, é importante avaliar a sensibilidade da cultura de forma prévia, pois independente do agente de seleção escolhido, a regeneração de brotos tende a reduzir drasticamente (FOLTA et al., 2006 b) e além disso, doses elevadas podem causar efeito fito toxico inclusive em brotos transformados (KARAMI et al., 2009).

Dentre os genes de seleção utilizados em morangueiro, muitos autores utilizam o gene *nptII*, que confere resistência aos antibióticos do grupo dos aminoglicosídios (Neomicina, Canamicina e Gentamicina) às células transformadas (MARCELLINO; ROMANO; GANDER, 2007; QIN et al., 2011). Estes antibióticos inibem o crescimento de plantas não transformadas, pois estas substancias se ligam a subunidade 30s ribossomal e desse modo inibem a iniciação da tradução dos plastídeos. Já células de plantas transformadas, contendo o gene *nptII*, são capazes de detoxificar estes antibióticos do meio de seleção (MOAZED, NOLLER, 1987).

Outro gene de seleção utilizado na cultura do morangueiro é o gene *bar*, isolado a partir de *Streptomyces hygroscopicus*. Este gene codifica para a enzima fosfinotricina-acetiltransferase (PAT) que age inativando a substância fosfinotricina (PPT) e conferindo resistência às células transformadas (THOMPSON et al., 1987). O glufosinato de amônio é uma fosfinotricina sintética utilizada como ingrediente ativo de herbicidas. Em células não transformadas o glufosinato de amônio, análogo estrutural do glutamato, age inibindo a atividade da glutamina sintase e causando rápido acúmulo de amônia nas células e consequentemente levando a morte celular (TACHINANA et al., 1986). Assim, adicionada ao meio de cultura de regeneração de plantas transformadas com plasmídeos contendo o gene *bar*, seleciona apenas o desenvolvimento plantas transformadas.

Assim a obtenção de plantas transgênicas não depende apenas de um apropriado protocolo de transformação, mas também do estabelecimento prévio de um sistema eficiente de recuperação e identificação das plantas geneticamente modificadas (QIN et al., 2011).

CAPITULO I – Construção de um Plasmídeo Binário Capaz de Gerar um RNA de Interferência para Inibição da Tradução do Receptor de Etileno *FaETRI* em Morangueiro (*fragaria x ananassa*).

Resumo – O morangueiro é um fruto de elevado valor comercial que assim como muitos frutos carnosos sofre com a considerável perda de firmeza ao longo do amadurecimento. Classificado como fruto não-climatérico, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que envolvem sua maturação, dificultando o desenvolvimento de técnicas de conservação pós-colheita. Diferente do que acontece em frutos climatéricos, nos frutos não-climatéricos o papel do etileno na maturação não está definido, entretanto já se sabe que o etileno é uma molécula essencial ao processo regulatório. Além da biossíntese de etileno, a percepção e transdução do sinal são essenciais para a expressão de genes de resposta durante a maturação. Considerados elementos chave na modulação à resposta, em determinado estágio da maturação, o etileno liga-se ao seu receptor proteico na célula, e regula a respiração, o desenvolvimento de cor, o aumento da maciez e dos açúcares solúveis, a redução da acidez, entre outros aspectos que caracterizam o amadurecimento e a senescência dos frutos carnosos. Dentre os receptores de etileno conhecidos em morango, acredita-se que por suas características estruturais, o receptor *FaETRI* desempenhe um papel superior aos demais e que sua inibição seja capaz de causar redução ou completa insensibilidade à presença de etileno. Utilizado para revelar a função de um gene através da redução ou completa eliminação de sua expressão, o silenciamento gênico por interferência do mRNA é um mecanismo natural que funciona em defesa do genoma e regula a expressão gênica. Podendo ser induzido pela introdução de sequencia auto complementar (hpRNA) do próprio gene alvo, o objetivo deste trabalho foi construir um cassete de expressão em formato de grampo com pequenas sequencias auto complementares separadas por uma região não complementar para agirem como RNA de interferência sobre o RNAm do gene *FaETRI* inibindo sua tradução em proteína receptora de etileno e assim, futuramente ser capaz de gerar plantas transformadas que sirvam de modelo de estudos ao entendimento da maturação dos frutos não-climatéricos e possibilitem o desenvolvimento de técnicas pós-colheita mais eficientes que reduzam as perdas e mantenham a qualidade nutricional dos frutos por mais tempo.

Palavras-chave: Silenciamento gênico, grampo de interferência de RNA, gene *FaETRI*.

Abstract – Strawberry is a high fruit business value that as well as many fleshy fruits suffers with considerable loss of firmness during ripening. Classified as non-climacteric fruit, little is known about the mechanisms involved in its maturation, hindering the development of post-harvest techniques. Unlike what happens in climacteric fruits, in non-climacteric fruits not known for sure the role of ethylene in the regulation of maturation, however we know that this is a molecule essential to the regulatory process. In addition to ethylene biosynthesis, perception and signal transduction are too essential for the response gene expression during ripening. Considered key elements in modulating the response, at a certain stage of ripening, ethylene binds to its receptor protein in the cell and regulates breathing, the color development, increased softness and soluble sugars, reducing acidity, among other aspects that characterize the ripening and senescence of fleshy fruits. Among the receptors known in ethylene strawberry, it is believed that structural characteristics of the receiver FaETR1 play a superior role to the other and that their inhibition is capable of causing reduction or complete insensitivity to the presence of ethylene. Used to reveal the function of a gene through the reduction or complete elimination of expression, gene silencing by interference of mRNA is a natural mechanism that works in defense of the genome and regulates gene expression. May be induced by the introduction of self complementary sequence (hpRNA) of the target gene itself, the objective was to build an expression cassette in clip format with small self complementary sequences separated by a non-complementary region to act as RNA interference on the FaETR1 gene mRNA inhibiting its transcription ethylene receptor protein and thus, in the future be able to generate transformed plants that will serve as a model for the study understanding of the maturation of non-climacteric fruit and allow the development of more efficient post-harvesting techniques that reduce losses and maintain the nutritional quality of fruit longer.

Keywords: Gene Silencing, Hairpin RNA interference, *FaETR1* gene.

1. INTRODUÇÃO

A regulação da expressão gênica através do RNAi (RNA de interferência) é um mecanismo molecular presente em muitas espécies eucarióticas e responsável pela estabilidade do genoma (MOAZED, 2009). Nesta via de regulação pós-transcricional, o RNAm, complementar ao RNAi, é degradado ou sua tradução é bloqueada (TIWARI et al., 2014).

Em plantas, esta via pode ser ativada pela introdução artificial de fragmentos do gene alvo de cadeia linear (*antisense*RNA ou *sense*RNA) ou com capacidade de formar estruturas secundárias em formato de grampo (*hairpin*RNA ou hpRNA) (SMITH et al., 2000).

A estrutura em forma de grampo (hpRNA) contém uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma região do gene alvo (*sense*) e também uma sequência complementar a essa mesma região (*antisense*). As duas sequências são separadas por uma região não complementar. Após a transcrição, as pontas complementares se hibridizam formando uma estrutura em formato de grampo, denominado hpRNA. O hpRNA é clivado pela enzima Dicer (uma endonuclease tipo RNase III) em pequenos fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos chamados de siRNAs. Os siRNAs atuam como sonda, identificando os RNAm que possuem sequência de ribonucleotídeos complementar à sua. Uma vez ligado ao RNAm alvo, o RNA dupla fita ativa o complexo RISC e o RNAm é clivado, impedindo a síntese proteica (TIWARI et al., 2014).

Na presença de um hpRNA, o processo de excisão do íntron pelo spliceossomo pode ajudar a alinhar os braços complementares do hpRNA promovendo a formação do RNA dupla fita. Além disso, esta alça tende a ser menos sensível às nucleases, mantendo a estrutura em formato de grampo até a ação da Dicer (SMITH et al., 2000).

Mais eficiente que a inserção apenas de fragmentos lineares (SMITH et al., 2000 - figura 6), a construção de cassete de interferência em formato de hpRNA pode ser usada para reduzir ou eliminar a função de um gene alvo (HELLIWELL; WATERHOUSE, 2003; TIWARI et al., 2014).

Em morangueiro, cultura usada como modelo de estudos sobre maturação de frutos não-climatéricos, o silenciamento pós-transcricional usando hpRNA pode revelar funções de genes específicos durante o crescimento, desenvolvimento e maturação dos frutos. No que se refere à maturação de frutos não-climatéricos pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que envolvem este processo, pois diferente do que acontece em frutos climatéricos, o papel do etileno ainda não foi completamente elucidado (VILLARREAL et al., 2010). Embora se saiba que o etileno é uma molécula de sinalização necessária no amadurecimento de frutas de

morango, ainda não se sabe ao certo qual sua interação com outros reguladores do crescimento vegetal (TRAINOTTI et al., 2005; BAPAT et al., 2010; SUN et al., 2013).

Além da biossíntese do etileno, mecanismos de percepção e transdução de sinal são necessários para desencadear a expressão de genes responsivos ao etileno (PECH et al., 2012), os quais geram o desenvolvimento de cor, aumento da maciez e de açúcares solúveis e redução da acidez, entre outros aspectos que caracterizam o amadurecimento e a senescência dos frutos (BARRY; GIOVANNONI, 2007).

Considerados elementos chave na modulação à resposta, os receptores de etileno foram os primeiros receptores hormonais identificados em plantas (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). Em *A. thaliana*, planta usada como modelo de estudo dos receptores de etileno, foram identificadas até o momento cinco isoformas de receptores classificadas em duas subfamílias (Subfamília I - ETR1 e ERS1 \ Subfamília II - ETR2, ERS2 e EIN4) de acordo com características estruturais compartilhadas (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007; HALL et al., 2012; LACEY; BINDER, 2014). Já em morangueiro, apenas três genes receptores de etileno, dois da subfamília I (FaETR1 e FaERS1) e um da subfamília II (FaETR2) foram identificados até o momento (TRAINOTTI et al., 2005).

A expressão dos genes de resposta ao etileno é dependente da ligação do etileno ao receptor presente na membrana do retículo endoplasmático e um modelo de regulação do sinal foi descrito em *A. thaliana*. Uma vez ligado, os receptores inativam a proteína cinase CTR1 (do inglês, *Constitutive Triple Response*), a qual se torna incapaz de fosforilar e inativar a proteína EIN2. A proteína EIN2 ativada libera seu domínio C-terminal para o núcleo e ativa os fatores de transcrição EIN3, EIL e ERF (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007). Na ausência de etileno os receptores não inativam a proteína cinase CTR1. A CTR1 ativada, fosforila a proteína EIN2, inativando-a. Desta forma a proteína EIN2 não consegue ativar os fatores de transcrição envolvidos na resposta ao etileno (HALL; SHAKEEL; SCHALLER, 2007).

Embora os receptores de etileno apresentem semelhanças estruturais, a sensibilidade ao etileno pode ser dependente da interação receptor-proteína CTR1. Apesar de haver sobreposição funcional entre os receptores, os da subfamília-I parecem apresentar maior sensibilidade ao etileno, provavelmente porque possuem o domínio Histidina cinase conservado (HALL et al., 2007; HALL et al., 2012). Em *A. thaliana* a perda de função de todos os receptores da subfamília-II manteve a sensibilidade da planta ao etileno enquanto que a perda de função de apenas um receptor da subfamília I (ETR1) produziu plantas insensíveis ao etileno (CANCEL; LARCEN, 2002). A insensibilidade ao etileno ocorreu provavelmente

porque a perda da função do receptor da subfamília-I deixou a proteína cinase CTR1 ativada, mesmo na presença de etileno, e assim, EIN2 foi inativado por fosforilação, não ativando os genes de resposta ao etileno (HALL et al., 2007). Em *F. ananassa*, a inserção de um alelo dominante negativo (gera um produto gênico alterado capaz de agir de forma antagônica ao alelo causando perda de função) do receptor de etileno ETR1 isolado do mutante *etr1-1* de *A. thaliana* gerou plantas com reduzida sensibilidade ao etileno (MERCHANTE et al, 2013), entretanto ainda não existem relatos da completa inibição de algum receptor de etileno em morango.

Desta forma, acreditamos que a construção de um cassete de expressão capaz de gerar hpRNA do gene *FaETR1* possa inibir a síntese da proteína receptora de etileno ETR1. Assim, em plantas transformadas, possivelmente o gene CTR1 se manterá ativado mesmo na presença de etileno, inibindo a transcrição de genes de resposta, e portanto, possibilitando um maior entendimento do papel do etileno e sua interação com outros reguladores do crescimento vegetal (PGR - do inglês, Plant Growth Regulator) na maturação de frutos de morangueiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Construção de *primers* específicos e isolamento dos fragmentos do gene *FaETR1*

A construção do RNA de interferência em formato de grampo (hpRNA) foi baseada na sequência EST do gene *FaETR1* disponível no banco de genes NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com número de acesso AJ297511.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ297511.1>). O gene *FaETR1* contém 2773 nucleotídeos com uma região codificante do nucleotídeo 286 até 2511.

Utilizando o programa BLOCK-iTTM RNAi Designer (INVITROGEN) (<https://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>) foi possível identificar os potenciais siRNAs que poderiam se formar. Cruzando as informações com o programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) foram escolhidos *primers* iniciadores que compreendiam duas regiões de mais ou menos 21 nucleotídeos apontadas como potenciais siRNA.

Os *primers* selecionados foram modificados para conterem sítios de restrição para as enzimas *Xho*I – *Kpn*I (fragmento *sense*) e *Xba*I – *Bam*HI (fragmento *antisense*) próximas às suas extremidades 5' (Tabela 1). Os parâmetros para a amplificação dos fragmentos foram determinados também com o auxílio do programa Primer3Plus.

Tabela 1. Sequências de *primers* desenhados para a amplificação dos fragmentos desejados (*sense* e *antisense*) referentes a uma região específica do gene *FaETR1* de *Fragária ananassa* proposta para agir como potencial RNAi. Regiões sublinhadas indicam o sítio de restrição das enzimas ao lado referidas.

Primers	Sequências 5' – 3'	Sítios de restrição
<i>FaETR1</i> _Sense_F	5' GTGCTCGAGAGGGAAATGG 3'	<i>XhoI</i>
<i>FaETR1</i> _Sense_R	5' GAGAGGTACCCGAAGTCAAC 3'	<i>KpnI</i>
<i>FaETR1</i> _Antisense_F	5' GTGTCTAGACTAGGGAGTTGTTTTGAAG 3'	<i>XbaI</i>
<i>FaETR1</i> _Antisense_R	5' GGGGGATCCGCGATATCTT 3'	<i>BamHI</i>

Ao longo do trabalho foram utilizados diferentes plasmídeos de acordo com as necessidades e particularidades de cada um. Todos os plasmídeos utilizados e desenvolvidos neste trabalho estão listados na tabela 2.

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeos	Genótipo\Fenótipo Relevantes	Referência\ Fonte
pGEMT - <i>Easy</i>	Vetor de clonagem, <i>lacZ</i> , Amp ^R	Promega [®]
pGMA	<i>pGEMT-Easy</i> contendo o fragmento <i>antisense</i>	Este trabalho
pGMS	<i>pGEMT-Easy</i> contendo o fragmento <i>sense</i>	Este trabalho
pKANNIBAL	Vetor de clonagem, promotor CaMV35S, PDK íntron, terminador OCS, Km ^R	WESLEY et al., 2001
pKNA	pKANNIBAL contendo fragmento <i>antisense</i> (BamHI\XbaI)	Este trabalho
pKNAS	pKANNIBAL contendo fragmentos <i>antisense</i> (BamHI\XbaI) e <i>sense</i> (XhoI\KpnI)	Este trabalho
pCAMBIA 3301	Vetor de expressão, <i>lacZ</i> , <i>Bar</i> ^R	CAMBIA [®]
pCAMBIA2301	Vetor de expressão, <i>lacZ</i> , Kan ^R	CAMBIA [®]

2.2 Amplificação dos fragmentos *sense* e *antisense* do gene *FaETR1* e clonagem no vetor pGEM-T Easy

As amplificações dos fragmentos *sense* e *antisense* foram realizadas utilizando o DNA total de morangueiro, extraído com kit de extração de DNA vegetal Axygen® a partir de folhas jovens de plantas cultivadas *in vitro*.

Para otimizar a amplificação do fragmento *sense* (380 pb) e do fragmentos *antisense* (351 pb), as reações de amplificação utilizaram a técnica de *Nested* PCR onde um fragmento maior, previamente amplificado, serve de DNA molde. Neste caso um fragmento de 421pb gerados pelos *primers* *FaETR1*Antisense_F e *FaETR1*Sense_R. As reações de PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction) foram montadas com volume final de 20µL contendo 2µL de tampão de reação (10x), 0,6µL de MgCl₂ (50mM), 0,4µL de dNTPs (10mM), 1µL de *primer forward* (10mM) e 1µL de *primer reverse* (10mM), 1µL de DNA total e 0,2µL de *Taq* DNA polymerase (5U\µL) (INVITROGEN). As condições de reação foram: 1 ciclo de desnaturação à 94°C por 5 min; seguidas por 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 45s, anelamento à 58,5°C por 1min, extensão à 72°C por 1:30min. Finalizando com um ciclo de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, a reação foi tratada com uma unidade da ExonucleaseI (ExoI BioLabs® -20U\µL) para degradação de *primers*, e a Fosfatase Alcalina de Camarão (Sap USB® - 1U\µL) para desfosforilação dos dNTPs, por 1,5h a 37°C, seguido de inativação à 80°C por 30min. Em seguida a reação foi diluída e o amplificado foi usado como molde para amplificação dos fragmentos *sense* (380 pb) e *antisense* (351 pb) utilizando os mesmos padrões de reação, entretanto as condições de reação foram: 1 ciclo de desnaturação à 94°C por 2 min; seguidas por 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 45s, anelamento à 53°C para *sense* e 65,6° para *antisense* por 30s, extensão à 72°C por 1min. Finalizando com um ciclo de 72°C por 10 min.

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1,8% em TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) corado em solução de brometo de etídeo à 0,5mg\L por 20 min, seguido de lavagem em água destilada por mais 20 min. O padrão de bandas foi visualizado sob luz ultravioletae e a imagem foi capturada com o auxílio do equipamento Fusion Fx Viber Lourmat. Os fragmentos *sense* e *antisense* foram então ligados ao vetor pGEM-TEasy (Promega®) conforme recomendações do fabricante e estas ligações deram origem aos plasmídeos pGMA e pGMS (Tabela 4) O mapa de restrição do vetor pGEM-TEasy (Promega®) encontra-se nos anexos.

2.3 Preparo de *Escherichia coli* DH10B eletrocompetente

Com o auxílio de um palito de dente autoclavado, foi estriado uma suspensão bacteriana de *E. coli* DH10B em uma placa de petri contendo meio LB. A placa foi mantida à 37°C por 16h para o crescimento das colônias. Após, três colônias isoladas de 1 a 2 mm de diâmetro foram transferidas para 5ml de meio líquido LA e mantidas sob agitação (180rpm) e temperatura de 37°C por 16h. Em seguida 400µL da suspensão bacteriana crescida foram adicionados em 250ml de meio SOB (20g\L de Triptona; 5g\L de Extrato de Levedura; 0,584g\L de NaCl e 0,186g\L de KCl) em um ellenmayer de 1L de capacidade. As células foram cultivadas sob agitação (180rpm) e temperatura de 37°C até atingirem uma DO (densidade ótica) a 600nm em torno de 0,7 a 0,8. Após atingirem o ponto de crescimento o erlenmeyer contendo a cultura foi submetido imediatamente à banho de gelo por ~30min. Em seguida o volume da cultura foi dividido em 5 tubos de centrifuga com capacidade para 50ml e as células foram centrifugadas à 1000g por 15min sob 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet de células foi ressuscitado gentilmente em igual volume de glicerol 10% gelado. As células foram centrifugadas à 1000g por 20min sob 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet foi ressuscitado gentilmente em metade do volume de glicerol 10% gelado. Novamente as células foram centrifugadas à 1000g por 20min sob 4°C e o sobrenadante descartado. Os pellets dos 5 tubos de centrifuga foram ressuscitados gentilmente em 1\4 de volume de glicerol 10% gelado e re-agrupados em apenas um tubo. As células foram novamente centrifugadas à 1000g por 20min sob 4°C e o sobrenadante descartado. Por fim o pellet foi ressuscitado em aproximadamente 1ml de glicerol 10% gelado e as células eletrocompetentes prontas foram divididas em volumes de 100µL aliquotadas em tubos de microcentrifuga e armazenadas em ultra-freezer à -80°C.

2.4 Eletroporação em *E. coli* DH10B.

Células de *E. coli* eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação segundo Sambrook et al, (1989). Em 40µL de células foi adicionado 1µL da reação de ligação e esta mistura foi acondicionada entre os eletrodos das cubetas de eletroporação geladas e em seguida levadas ao eletroporador Bio Rad Micropulser para o choque de 1,8kV por no máximo 5 segundos. Para recuperação das células foi adicionado 1mL de meio SOC (20g\L de triptona, 5g\L de extrato de levedura, 0,6g\L de NaCl, 0,19g\L de KCl, 0,94g\L de MgCl₂ e 3,6g\L de Glucose, pH7,0) na cubeta. A mistura foi transferida para um frasco de 10mL, autoclavado e a cultura foi incubada à 37°C por 3h sem agitação. Após este período, 200µL da cultura foram plaqueada em placas de petri de 5cm de diâmetro contendo 25mL de meio de

cultura LA (10g/L de caseína, 5g/L de extrato de levedura, 5g/L de NaCl e 15g/L de ágar bacteriológico) acrescido de 10µg/mL de estreptomicina, 250 µg/mL de ampicilina e 50mg/L de X-Gal. As placas foram incubadas à 37°C por cerca de 16h.

2.5 Análise das *E. coli* DH10B transformadas

Para análise dos transformantes, colônias de interesse foram inoculadas em 3mL de meio LB (10g/L de caseína, 5g/L de extrato de levedura e 5g/L de NaCl) com 10µg/mL de estreptomicina e 250 µg/mL de ampicilina e incubadas à 37°C por aproximadamente 16h. Em seguida 1,5mL foi utilizado para extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo de MiniPrep de Sambrook et al, (1989) e 1,5mL foi usado para estocagem em glicerol à -20°C (concentrado por centrifugação e resuspensão em 1mL de glicerol 50%). Após a extração do DNA plasmidial, foram realizadas PCRs nas mesmas condições já descritas no item 2.2 visando confirmar a presença dos fragmentos de interesse nos vetores pGMA e pGMS.

2.6 Clonagem dos fragmentos *sense* e *antisense* vetor pKANNIBAL

Os fragmentos *sense* e *antisense* presentes no vetor pGEM-T *Easy* foram clivados com as enzimas *Xho*I (INVITROGEN) e *Xba*I (FERMENTAS), respectivamente. Após a linearização do vetor, na reação de clivagem para liberação do fragmento *sense*, foi adicionado 3 volumes de etanol absoluto e incubado por 3h à -20°C. Em seguida o DNA foi precipitado por centrifugação à 13000g por 30 min. O etanol foi descartado e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 70% e novamente centrifugado à 13000g por 10 min para eliminação dos sais presentes. Após a secagem do *pellet*, um novo sistema de restrição foi montado, agora contendo a enzima *Kpn*I (INVITROGEN). Na reação de clivagem para liberação do fragmento *antisense*, as enzimas *Xba*I (FERMENTAS) e *Bam*HI (FERMENTAS) trabalham sob o mesmo tampão de clivagem, não sendo necessária a precipitação, desta forma nesta reação, após a linearização do vetor contendo o fragmento *antisense*, foi adicionado a enzima *Bam*HI (FERMENTAS) para sua liberação. Os resultados das clivagens foram visualizados em gel de agarose 0,8%.

Posteriormente, os fragmentos *sense* e *antisense* liberados de pGMS e pGMA, respectivamente, foram tratados com uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) para eliminação das enzimas de restrição. Os volumes dos sistemas de restrição (200µL), para liberação dos fragmentos *sense* e *antisense*, foram duplicados com a adição de água MiliQ autoclavada e foi adicionado 100µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). Após homogeneização em vortex, a solução foi centrifugada à 13000g por 5min e

aproximadamente 350µL do sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para um tubo de microcentrífuga novo e autoclavado. À este volume foi adicionado 1050µL (correspondente a 3 volumes) de etanol absoluto (Merck) gelado e 30µL de acetato de amônia 7,5M. A mistura foi homogeneizada e mantida a -20°C por 1h. Em seguida foi centrifugada à 13000g por 30 min e o etanol foi descartado sobrando apenas o *pellet* de DNA. O *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 70% e posteriormente o *pellet* foi seco em estufa à 37°C por aproximadamente 3h. Após a secagem o *pellet* foi ressuspensionado em 10µL de Água MiliQ autoclavada e 1µL foi usado para visualização em gel de agarose 1%.

O vetor pKANNIBAL foi clivado primeiramente com *Xba*I (FERMENTAS) e *Bam*HI (FERMENTAS) e desfosfatado com a enzima SAP (USB®) à 37°C por 1,5 h seguido de inativação à 80°C por 30min. Em seguida o vetor foi lavado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol conforme descrito anteriormente. O fragmento *antisense* foi ligado ao vetor pKANNIBAL utilizando T4 DNA Ligase USB® seguindo as recomendações do fabricante e dando origem ao plasmídeo pKNA (Tabela 4) A transformação do plasmídeo recombinante em *E. coli* DH10B e a análise dos transformantes seguiu o descrito nos itens 2.4 e 2.5.

Os procedimentos de ligação, clonagem e análise dos transformantes foram repetidos para o fragmento *sense* utilizando o vetor pKNA e dando origem ao vetor pKNAS (Tabela 4).

2.7 Clonagem no vetor pCAMBIA 3301 e pCAMBIA 2301

A construção contendo o promotor CaMV 35s seguido das sequências *sense*, *intron* e *antisense*, contendo terminador OCS será liberada do vetor pKNAS através de clivagem com *Sac*I (INVITROGEN), seguida de precipitação em etanol e clivagem com *Pst*I (INVITROGEN). Os vetores pCAMBIA 3301 e pCAMBIA 2301 (Tabela 4) também serão clivados com as mesmas enzimas e ambos (vetores e cassete) serão lavados com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e precipitado com etanol conforme descrito anteriormente. O cassete de expressão será então ligado com T4 DNA Ligase USB® seguindo as recomendações do fabricante. As etapas de transformação em *E. coli* DH10B e a análise dos transformantes seguirão conforme já descrito.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O receptor de etileno *FaETR1* apresenta 83% de similaridade de aminoácidos com seu ortólogo ETR1 de *A. thaliana*. Este receptor apresenta um gene de 2773 nucleotídeos de comprimento, contendo 285 nucleotídeos da região 5' UTR (do inglês, *Untranslated Region*), 2226 nucleotídeos de região codificante (ORF – do inglês, *Open Reading Frame*), e 262 nucleotídeos de região 3'UTR. A proteína apresenta 741 aminoácidos de comprimento, com massa molecular de 83122 Da e um ponto isoelétrico hipotético de 7,23 (TRAINOTTI et al., 2005). Observando as informações de regiões potenciais para agirem como siRNA após a transcrição (programa BLOCK-iTTM RNAi Designer - INVITROGEN), foram desenhados 2 pares de *primers* sobre a mesma região para apresentarem auto complementariedade quando inseridos em sentidos opostos (Figura 8).

1	ACCAGAGTGCCTCATTCTTCTCTCTAATCCAAGCTCTCTGAGAGGCTCAGAGCTCTAATGAACCCCAATCCCTCAAGACC	80
1	TGGTCTCACGGAGTAAGAAGAGAGATTAGGTTTCGAGAGACTCTCCGAGTCTCGAGATTACTTTGGGTTAGGGAGTTCTGG	80
81	TCCCCATCACCAGCAACAGCAACTGTTGATTCTCCCGGCGACCACGATCCAGGTGACCTCATTCCCGTCTTTAATTTCTT	160
81	AGGGGTAGTGGTCGTTGTCGTTGACAACCTAAGAGGGCCGCTGGTGCTAGGTCCACTGGAGTAAGGGCAGAAATTAAGAA	160
161	GCTAGACAAAACAGTAGCCACAATTGGATTGTTTTGATACGAATTGGGGTCGATTCTGTTTGCCTTGACTGTTTAGG	240
161	CGATCTGTTTTTGGTCATCGGTGTTAACCTAACAAAAGCTATGCTTAACCCAGCTAAGACAAACGGAACGTGACAAATCC	240
241	GTTTTAGGGCCCTTTAGAATCGGTGATCATAGGATTCTCAATCTCTGATGAGGCTGTAAGTGTATCGAGCCGCAATGGCC	320
241	CAAAATCCCGAAATCTTAGCCACTAGTATCCTAAGAGTTAAGACTACCTCCGGACATTGACATAGCTCGGCTTACCGG	320
321	GGCCGATGAGCTACTCATCAAGTATCAATACATTTTCGGACTTTTTATTGCTCTTGCATATTTTCAATCCCTCTAGAGT	400
321	CCGGCTACTCGATGAGTAGTTCATAGTTATGTAAAGCCTGAAAAATAACGAGAACGTATAAAAGTTAGGAGATCTCA	400
401	TGATATACCTTTGTGAAGAAATCTGCGGTGTTTCCGTATAGATGGGTCTTGTGCAGTTTGGTGCATTGTTGTTGTGC	480
401	ACTATATGAAACACTTCTTTAGACGCCACAAAGGCATATCTACCCAAGAACACGTCAAACCACGTAAGTAACACAACACG	480
481	GGCGCCACGCATCTTATTAACCTTGTGACTTTCAACATGCATTCTAGGACTGTGGCTATAGTTATGACTACTGCCAAGGT	560
481	CCGCGGTGCGTAGAATAATTGAACACCTGAAAGTTGTAGCTAAGATCCTGACACCGATATCAATACTGATGACGGTTCCA	560
561	TCTGACTGCTGTGGTGTCTGCGCCACGGCATTGATGCTTGTGCATATAATTCCTGACTTGTGTAGTGTAAAGACTAGGG	640
561	AGACTGACGACACCCACAGCACGCGGTGCGTAACACGACGATATTAAGGACTGAACAACCTCACAAATCTGATCCCG	640
641	AGTTGTTTTTGAAGAATAAGGCTGCCGAGCTTGATAGGGAATGGGGCTGATTAGGACTCAGGAGGAACTGGTCGGCAT	720
641	TTATTCGACGGCTTTCGAACTATCCCTTTTACCCGACTAATCCTGAGTCCTCCTTTTGACCAGCCGTA	720
721	GTTAGGATGCTGACCCATGAGATCAGAGTACTCTTGATAGGCATACATCTGAAAACACACTGGTTGAGTTAGGTAG	800
721	CAATCTACGACTGGGTACTCTAGTCCTCATGAGAACTATCCGTATGATATGACTTTTGGTGTGACCAACTCAATCCATC	800
801	GACTTTGGCATTGGAAGAGTGTGCGTTTGGATGCCACGCGTACTGCGTTGGAGTTGCAGCTATCGTATACACTCCGTC	880
801	CTGAAACCGTAACTTCTCACACGCAACACCTACGGGTGCGCATGACGCAACCTCAACGTCGATAGCATATGTGAGGCAG	880
881	AGCAGAATCCTGTAGGACATAACGTAACCATACATCTTCTCTGTGATCAATCAAGTGTTTAGTAGCAACCGTGTGTGAAG	960
881	TCGCTTAGGACATCCTGTATGGCATGGGTATGTAGAAGGACACTAGTTAGTTTCAAAATCATCGTTGGCAGACACTTC	960
961	TATAGCGGCTTAGGGGG 5'	1040
961	TATAGCGGCTTAAGGGGCCACCGTTCTGAATCCGGTGAACACCCCTTTCGTATACGGACCTCTCCAACAACGTCGAAGCGCA	1040
1041	CTGCACCTCTCGAACTTCCAAATCAATGATTGGCCAGAGCTCTCAACTAAACGTTATGCCTTGATGGTTTGTGA	1120

1041	GGGAGAGGACGTGGAGAGCTTGAAGGTTTAGTTACTAACCGGTCTCGAGAGTTGATTGCAATACGGAACCTACCAAACT	1120
1121	M L P C D S A R Q W H V H E L E L V E V V A D Q V A V	1200
1121	TGCTCCCTTGTGATAGTGCAGGCAATGGCATGTGCATGAGTTAGAGCTTGTGAGGTGGTTGCTGACCAAGGTAGCAGTT	1200
1201	ACGAGGGAACACTATCACGTTCCGTTACCGTACACGTACTCAATCTCGAACAACCTCCACCAACGACTGGTCCATCGTCAA	1200
1201	A L S H A A I L E E S R R A R D L L M E Q N I A L D L	1280
1201	GCTCTCTCACATGCTGCAATCTTAGAAGAGTCAAGGAGGGCAAGGATCTACTAATGGAGCAGAATATTGCACTCGATCT	1280
1281	CGAGAGAGTGTACGACGTTAGAATCTTCTCAGTTCTCCCGTCCCTAGATGATTACCTCGTCTTATAACGTGAGCTAGA	1280
1281	A R R E A E T A I R A R N D F L A V M N H E M R T P	1360
1281	AGCTAGGAGGGAAGCAGAAACAGCGATTCTGTCTCGCAATGATTTCTTGGCAGTAATGAACCATGAATGAGAACTCCGA	1360
1361	TCGATCCTCCCTTCGCTCTTGTGCGTAAGCAGAGCGTTACTAAAGAACCGTCATTACTTGGTACTTTACTCTTGAGGCT	1360
1361	M H A I I A L S S L L Q E T E L T P E Q R L M V E T I	1440
1361	TGCACGCAATTATTGCTCTTTCTTCATTGCTGCAGGAACTGAGCTGACACCGGAGCAGCGTCTAATGGTTGAGACAATA	1440
1441	ACGTGCGTTAATAACGAGAAAGAAGTAACGACGTCCTTTGACTCGACTGTGGCCTCGTCGCAGATTACCAACTCTGTTAT	1440
1441	L K S S N L L A T L I N D V L D L S R L E D G S L Q L	1520
1441	TTGAAGAGCAGCAACCTTTTGGCTACTCTGATAAATGATGTACTAGACCTTTCAAGACTTGAAGATGGCAGCCTTCAACT	1520
1521	AACTTCTCGTCGTTGGAAAACCGATGAGACTATTTACTACATGATCTGGAAAGTTCTGAACCTTCTACCGTCGGAAGTTGA	1520
1521	D I A T F N L H S V F I E V H N L V K P V A S V K K	1600
1521	TGACATAGCAACTTTTAACCTCCATTCTGTATTATAGAGGTTTATAATTTAGTTAAGCCTGTTGCATCTGTCAAAAAGT	1600
1601	ACTGTATCGTTGAAAATTGGAGGTAAACATAAGTATCTCCAAGTATTAAATCAATTCGGACACACGTAGACAGTTTTTCA	1600
1601	L S V T L N L A A D L P V Y A I G D E R R L L Q I I L	1680
1601	TGTCAGTTACATAAATTAGCAGCAGATTTGCCAGTTTATGCGATTGGTGATGAAAGGCGCCTTCTACAAATTATTCTA	1680
1681	ACAGTCAATGTGATTTAAATCGTCTTAAACGGTCAATACGCTAACCCTACTTTCCGCGGAAGATGTTTAAATAGAT	1680
1681	N V V G N A V K F S K E G S I S I T A F V A K S E S L	1760
1681	AATGTTGTTGGGAATGCTGTCAAGTTTCAAAGAGGGAGCATCTCAATTACTGCTTTGTTGCGAAATCAGAACTCTCT	1760
1761	TTACAACAACCCCTTACGACAGTTCAAAAGTTTCTTCCCTCGTAGAGTTAATGACGAAAACAACGCTTTAGTCTTAGAGA	1760
1761	R D F R A A D F F P V Q S D N H F Y L R V Q V K D S	1840
1761	AAGAGATTTCCGTGCTGCTGACTTTTTCTGTGCAAGTGATAATCACTTTTATCTGCGTGTACAGGTAAGATTTCAG	1840
1841	TTCTCTAAAGGCACGACGACTGAAAAAGGACACGTTTCACTATTAGTGAAATAGACGCACATGTCCATTTTCTAAGTC	1840
1841	G S G I N P Q D L P K L F T K F A Q N Q S L A T R N S	1920
1841	GATCTGGAATCAATCCCGAGGATCTTCCGAAGTTATTACCAAAATTTGCACAAAATCAGTCATTAGCTACTCGCAATTCT	1920
1921	CTAGACCTTAGTTAGGGGTCCTAGAAGGCTTCAATAAGTGTTTAAACGTGTTTTAGTCAGTAAATCGATGAGCGTTAAGA	1920
1921	G G S G L G L A I C K R F V N L M E G H I W I E S D G	2000
1921	GGTGGAAAGTGGACTTGGTCTTGCAATTTGTAAGAGATTTGTAAATCTCATGGAGGGGCATATTGGATTGAAAGTGATGG	2000
2001	CCACCTTCACCTGAACCAAGCGTTAAACATTCTCTAAACATTAGAGTACCTCCCGTATAAACCTAACTTTCACTACC	2000
2001	L G K G C T T T F I V K L G Y P E R S N E S K L P F	2080
2001	TCTAGGCAAGGATGCATACTACTTTTCTTGTGAACCTCGCTATCCGGAGCGATCAAATGAGTCTAAGCTGCCTTTTG	2080
2081	AGATCCGTTCCCTACGTGATGATGAAAGTAACACTTTGAGCCGATAGGCCTCGCTAGTTTACTCAGATTTCAGCGAAAAC	2080
2081	V P K M H T T H V Q T N F P G L K V L V M D D N G V S	2160
2081	TGCCTAAGATGCACACAACCTCATGTTCAAACAACCTTTCCAGGGTTGAAAGTTCTTGTGATGGATGATAATGGAGTCAGC	2160
2161	ACGGATTTCTACGTGTGTTGAGTACAAGTTTGTGAAAGGTCCCAACTTTCAAGAACAGTACCTACTATTACCTCAGTCG	2160
2161	R S V T K G L L E H L G C D V T T V S S S D E F L Q V	2240
2161	AGATCAGTTACAAAGGACTCCTTGAGCACTTGGGATGTGATGTAACAACCTGTAAGCTCAAGTGATGAGTTCTTGCAGT	2240
2241	TCTAGTCAATGTTTCCCTGAGGAACTCGTGAACCCCTACACTACATTGTTGACATTGAGTTCCTACTCTCAAGAACGTTCA	2240
2241	I S Q E H K V V F M D V C M P G I D G F E L A V Q I	2320
2241	TATTTACAGGAGCACAAGGTGGTGTTCATGGATGTGTATGCCTGGTATAGATGGTTTTGAAGTAGCCGTCAGATTTC	2320
2321	ATAAAGTGTCTCGTGTCCACCACAAGTACCTACACACATACGGACCATATCTACCAAACTTGATCGGCAGGTCTAAG	2320
2321	H E K F T K R H E R P V L V A L T G N I N K M T K E S	2400
2321	ATGAAAAGTTTACAAAACGTGATGAACGACAGTATTTGCACTTACTGGAAACATAAACAAGATGACAAAGGAGAGC	2400
2401	TACTTTTCAAAATGTTTGCAGTACTGTCTGGTCATAATCAACGTGAATGACCTTTGTATTGTCTTACTGTTTCTCTCG	2400
2401	C M R V G M E G V I L K P V S V D K M R S V L S E L L	2480
2401	TGCATGAGGGTTGGTATGGAAGGAGTTATACTTAAACCTGTTTTCAGTTGATAAAATGAGGAGTGTATTCAGAACTACT	2480
2481	ACGTACTCCCAACCATACCTTCTCAATATGAATTTGGACAAAGTCAACTATTTTACTCTCACAAAATAGTCTTGATGA	2480
2481	E H R V L F E A M	2560
2481	AGAGCATCGAGTTCTATTGAGGCCATGTAAGGATGCAGGAACATTGCTGCAGCTTAGAAAGTCTTCAATGGGAAAATTA	2560
2561	TCTCGTAGCTCAAGATAAACTCCGGTACATTCTACGTCCTTGTAACGACGTCGAATCTTTTCAAGGTTACCTTTTAAAT	2560
2561	GAGCTGAAAGCTTCTAAGCGGTAGCTATAGTGTGTATCGTGTACATAGAATGTGTCAATTTTATTGCAACACAATAAG	2640
2641	CTCGACTTTTCGAAGATTCGCCATCGATATCACACATAGCAGATGTATCTTACACAGTAAAAATAACGTTGTGTATTTC	2640
2641	GTGGATCGATGTTTTGCTGGGGGAAATTGTATGTTATGAGCTGTCTCCATGTATCTCTTCTGTGCGATAGTTACAAGAT	2720
2721	CACCTAGCTACAAAACGACCCCTTTAACATACAATACTCGACAGAGGTACATAGGAGAAGACACGCTATCAATGTTCTA	2720
2721	ATAGAAGCAAAATGAATAATGACCATCAATGTAAACTGATTATTGTTTACTG	2773
2721	TATCTTCGTTTAACTTATTACTGGGTAGTTACATTTGACTAATAACAAATGAC	2773

Figura 8. Sequencia EST do gene *FaETR1* disponível no banco de genes NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) com número de acesso AJ297511.1. As regiões grifadas em azul representam regiões identificadas pelo programa BLOCK-iTTM

RNAi Designer – INVITROGEN como potenciais siRNA. Flanqueando estas regiões, estão indicadas em amarelo regiões que representam os *primers Forward* e *Reverse* desenhados para amplificar uma região de 351bp chamada de região *Antisense*, e regiões grifadas em verde representando *primers Forward* e *Reverse* desenhados para amplificar uma região de 380bp chamada de região *sense*. Os asteriscos representam alterações nas bases (mismatches) a fim de constituir o sítio de restrição específico.

Utilizando como molde o DNA genômico do morango, primeiramente foi amplificado um fragmento de 421pb utilizando os *primers FaETRIAntisense_F* e *FaETRISense_R*. Em seguida, utilizando a técnica de *Nested PCR* este fragmento foi utilizado como molde para amplificar de fato os fragmentos auto complementares *sense* e *antisense* (Figura 11).

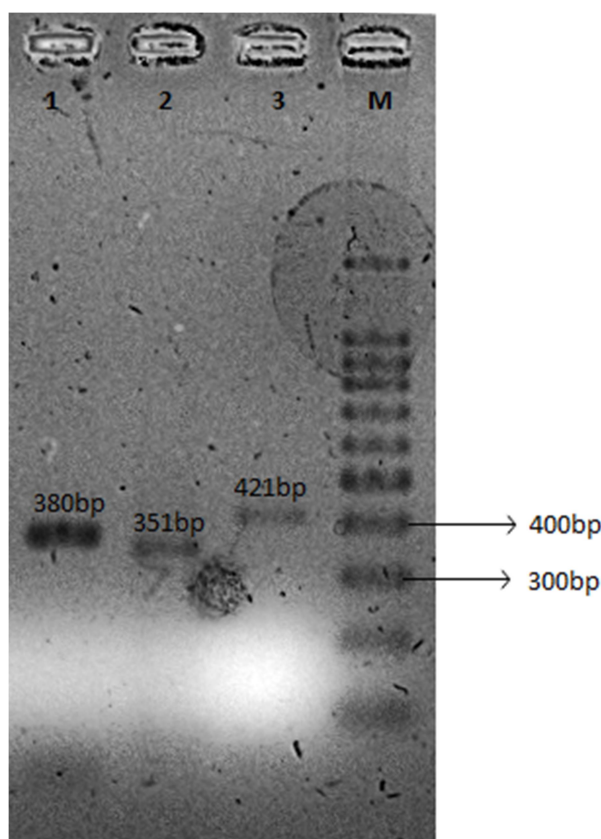


Figura 9. Amplificação dos fragmentos auto complementares *sense* e *antisense*. Coluna 1: fragmento *sense* com 380pb; coluna 2: fragmento *antisense* com 351pb; coluna 3: a fragmento de 421pb amplificado com os *primers FaETRIAntisense_F* e *FaETRISense_R* e utilizado como molde; coluna M: marcador de peso molecular 100bp BioLabs®.

Após a amplificação, os fragmentos foram ligados separadamente no vetor de multiplicação pGEM-T *Easy* o qual apresenta resistência à Ampicilina e propicia um alto número de cópias. Este vetor linearizado de aproximadamente 3kb, apresenta uma única Timina na extremidade 3' terminal, melhorando a eficiência de ligação dos produtos de PCR

(contendo Adenina na extremidade 5') e impedindo a recircularização do vetor. Além disso, pGEM-T *Easy* possui uma região de múltipla clonagem com vários sítios de restrição localizados sobre uma região codificadora da enzima β -galactosidase, permitindo a identificação dos recombinantes por coloração branco\azul das colônias. Após a ligação dos fragmentos, os vetores foram clonados em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B com resistência a estreptomicina 10 μ g/mL. As células transformadas foram plaqueadas em meio LA acrescido dos respectivos antibióticos e do substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) Promega® para atividade de β -galactosidase. Colônias cujo gene *lacZ* havia sido interrompido pela a inserção do fragmento apresentavam coloração branca por serem incapazes de sintetizar a enzima β -galactosidase. Já colônias azuis, capazes de sintetizar a enzima β -galactosidase e quebrar o substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole não continham o plasmídeo de interesse. Nestas colônias, a coloração azul se dá pela ligação de duas moléculas livres de 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole seguida de oxidação, formando o composto 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo que apresenta coloração azul (Figura 10).

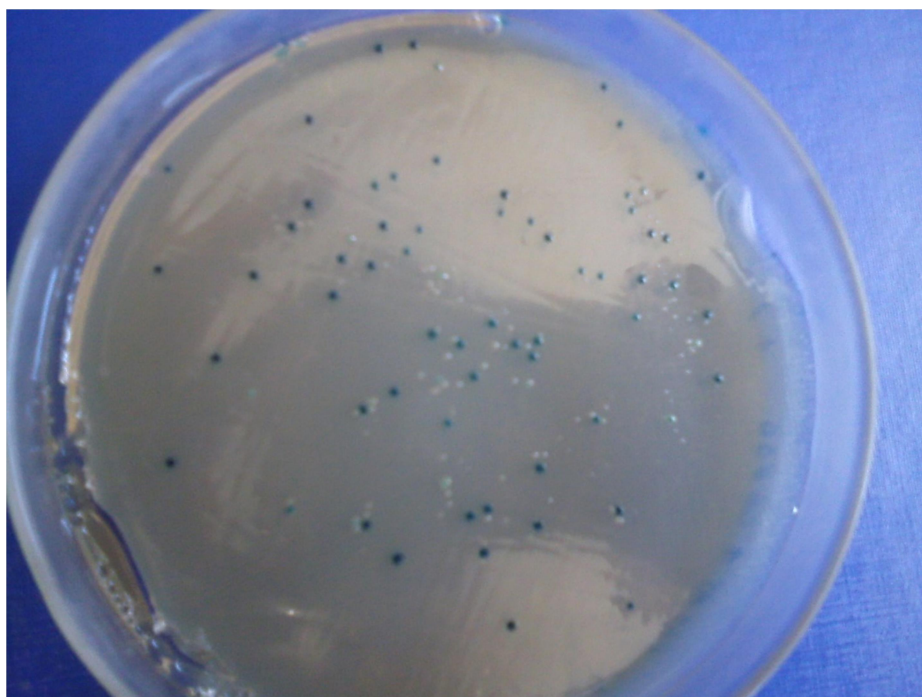


Figura 10. Placa de Petri contendo colônias de *E. coli* DH10B eletrotransformadas. Colônias brancas, incapazes de sintetizar a enzima β -galactosidase, contêm plasmídeos recombinantes, enquanto que as colônias azuis, capazes de sintetizar a enzima β -galactosidase e quebrar o substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) em galactose e 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole não contêm plasmídeos de interesse. Nestas colônias, a coloração

azul se dá pela ligação de duas moléculas livres de 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindole seguida de oxidação, formando o composto 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo que apresenta coloração azul.

Algumas colônias transformantes foram escolhidas para extração do DNA plasmidial e a clonagem foi confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos de cada fragmento (Figura 11)

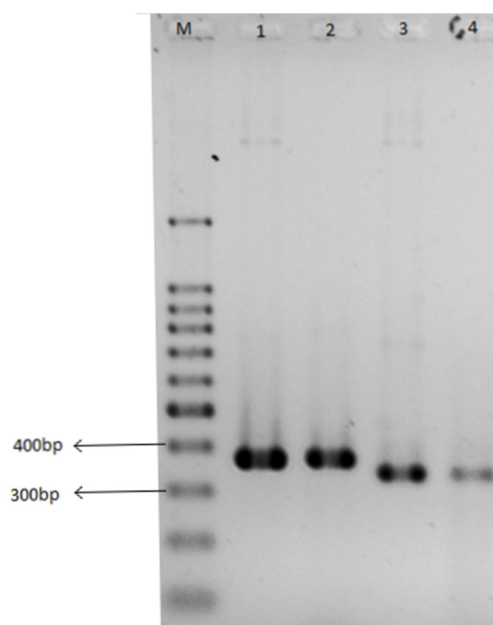


Figura 11. Confirmação da clonagem dos fragmentos *sense* (380pb) e *antisense* (351pb) no plasmídeo pGEM-T *Easy* por reação de PCR. Coluna 1: fragmento *sense* amplificado a partir de DNA plasmidial de uma colônia transformada; coluna 2: fragmento *sense* controle amplificado a partir de *Nested* PCR; coluna 3: a fragmento *antisense* amplificado a partir de DNA plasmidial de uma colônia transformada; coluna 4: fragmento *antisense* controle amplificado a partir de *Nested* PCR; coluna M: marcador de peso molecular 100bp BioLabs®.

Após a confirmação da clonagem os respectivos DNAs plasmidiais foram submetidos à clivagem para liberação dos fragmentos *sense* utilizando as enzimas de restrição *Xho*I e *Kpn*I e *antisense* utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Bam*HI. O vetor pKANNIBAL também passou por clivagem com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI para gerar complementariedade ao fragmento *antisense* (Figura 12). O vetor pKANNIBAL apresenta 6063bp e confere resistência a canamicina às bactérias transformadas. Este vetor é caracterizado por apresentar sítios de múltipla clonagem flanqueando uma região de íntron de aproximadamente 800bp entre o promotor CaMV35s e o terminador OCS. Esta conformação permite a construção de um cassete de transformação que dará origem a uma estrutura em formato de grampo

(hpRNA), possibilitando a ativação da maquinaria de RNAi para a inibição da tradução de um mRNA alvo específico. Entretanto as clonagens dos fragmentos *sense* e *antisense* precisam ser realizadas em momentos diferentes para manter esta conformação e não permitir a liberação da região de íntron.

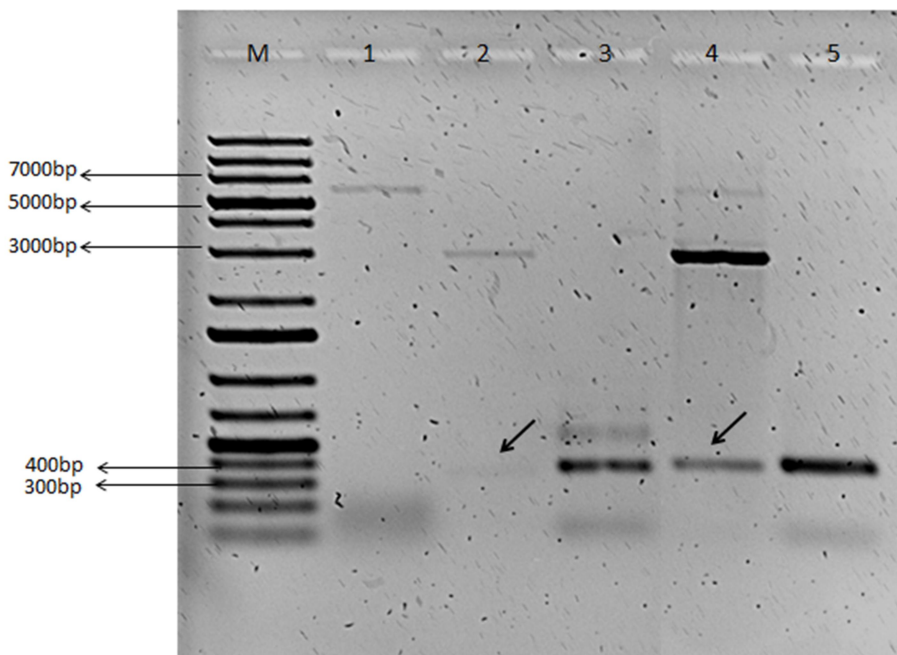


Figura 12. Confirmação da clonagem dos fragmentos *sense* (380pb) e *antisense* (351pb) no plasmídeo pGEM-T *Easy* por liberação das sequências por enzimas de restrição. Coluna 1: clivagem do plasmídeo pKANNIBAL (6063pb) com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI; coluna 2: clivagem do plasmídeo recombinante pGA com as enzimas *Xba*I e *Bam*HI para liberação do fragmento *antisense*; coluna 3: *Nested* PCR utilizada para gerar este fragmento *antisense* controle; coluna 4: clivagem do plasmídeo recombinante pGS com as enzimas *Xho*I e *Kpn*I para liberação do fragmento *sense*; coluna 5: *Nested* PCR utilizada para gerar fragmento *sense* controle; coluna M: marcador de peso molecular 1kb ThermoScience®.

Em seguida o fragmento *antisense* foi ligado ao plasmídeo pKANNIBAL e as células transformadas foram plaqueadas em meio LA acrescido dos respectivos antibióticos, onde no dia seguinte foi observado o crescimento de duas colônias transformadas. Estas foram submetidas à extração do DNA plasmidial e a clonagem foi confirmada por PCR utilizando os *primers* específicos do fragmento *antisense* (Figura 13)

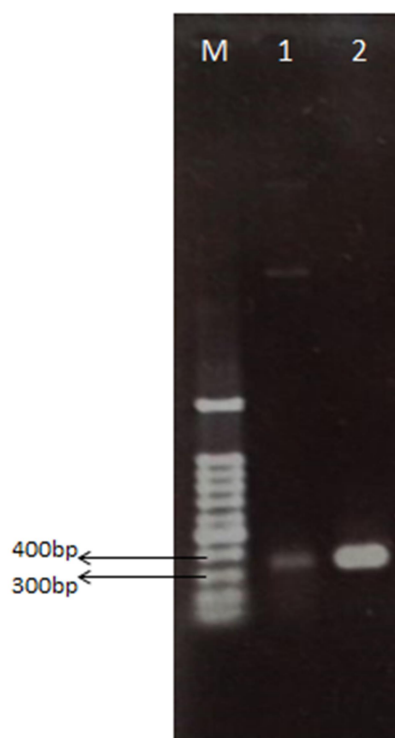


Figura 13. Confirmação da clonagem do fragmento *antisense* (351pb) no plasmídeo pKANNIBAL por PCR. Coluna 1: fragmento *antisense* amplificado a partir de DNA plasmidial de uma colônia transformada; coluna 2: fragmento *antisense* controle amplificado a partir de *Nested* PCR; coluna M: marcador de peso molecular 100bp BioLabs®.

O plasmídeo pKANNIBAL contendo o fragmento *antisense* denominado pKNA foi então clivado com as enzimas *Kpn*I e *Xba*I para receber o fragmento *sense* seguindo os mesmos procedimentos usados anteriormente. Após a eletroporação e recuperação das células transformadas, foi observado o crescimento de algumas colônias previstas para conterem o plasmídeo pKANNIBAL com ambos os fragmentos de interesse, denominado pKNAS. Utilizando a técnica de PCR foi possível observar a amplificação do fragmento *sense* (Figura 14).

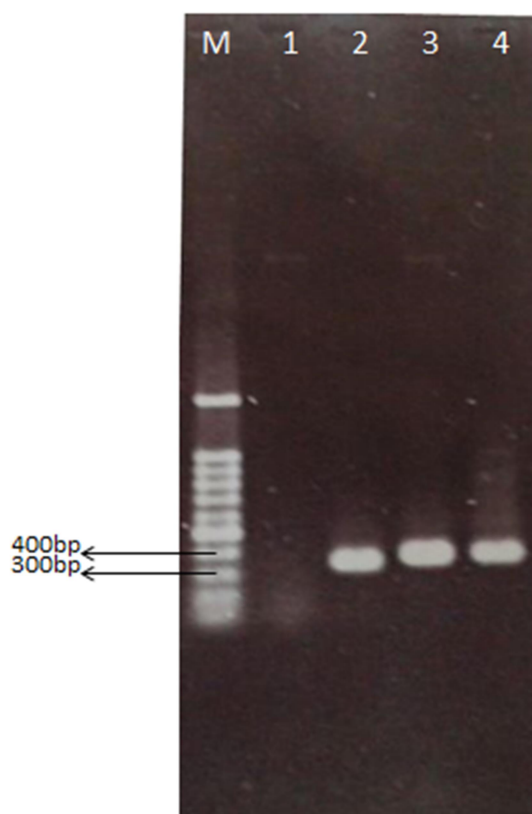


Figura 14. Confirmação da clonagem dos fragmentos *antisense* (351pb) e *sense* (380pb) no plasmídeo pKANNIBAL por PCR. Coluna 1: fragmento *antisense* amplificado a partir de pKNAS; coluna 2: fragmento *antisense* controle amplificado a partir de *Nested* PCR; coluna 3: a fragmento *sense* amplificado a partir de pKNAS; coluna 4: fragmento *sense* controle amplificado a partir de *Nested* PCR; coluna M: marcador de peso molecular 100bp BioLabs®.

Para confirmar a presença dos dois fragmentos clonados no pKANNIBAL, foram realizadas clivagens com a enzima de restrição *Bam*HI apenas para linearização e comparação do tamanho dos fragmentos. Foram comparados pKANNIBAL, pKNA e pKNAS. Para melhor visualização, foi novamente aplicada a restrição de pKNA na outra extremidade do gel (Figura 15).

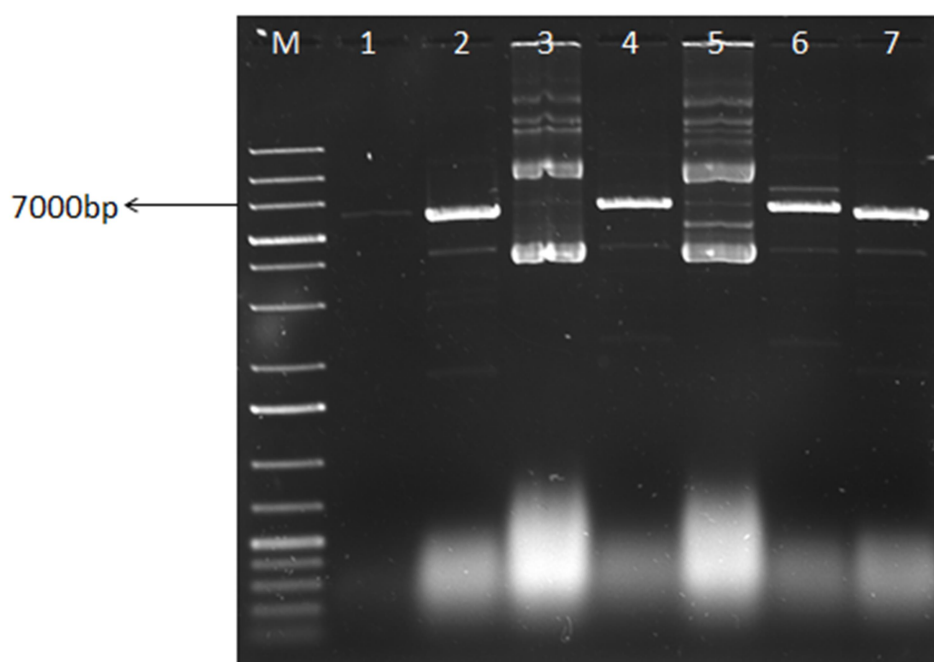


Figura 15. Confirmação da clonagem dos fragmentos *antisense* (351pb) e *sense* (380pb) no plasmídeo pKANNIBAL por comparação de tamanho das sequências linearizadas. Coluna 1: plasmídeo *pKANNIBAL* (6063bp); colunas 2 e 7: plasmídeo pKNA linearizado (6414pb); coluna 3: plasmídeo pKNA na sua forma circular; colunas 4 e 6: plasmídeo pKNAS linearizado (6794pb); coluna 5: plasmídeo pKNAS na sua forma circular; coluna M: marcador de peso molecular 1kb ThermoScience®.

Após a confirmação da ligação dos fragmentos *sense* e *antisense* no vetor de clonagem pKANNIBAL, esperamos obter a seguinte construção:



Figura 16. Representação esquemática da construção do cassete de expressão do hpRNA previsto para agir como RNAi, impedindo a tradução do gene que codifica a proteína receptora de etileno *FaETR1* em morangueiro.

4 CONCLUSÕES

Primers complementares a sequências que flanqueiam potenciais regiões formadores de RNAi foram identificadas no gene *FaETR1* e direcionaram a amplificação dos fragmentos *sense* e *antisense*. Esses fragmentos amplificados foram clonados no vetor pKANNIBAL de maneira consecutiva, formando o cassete de clonagem constituído do promotor CaMV 35S, seguido do fragmento *sense*, uma região de íntron, um fragmento *antisense* e o terminador OCS.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

A inserção desta construção em vetor pCAMBIA3301 e pCAMBIA2301 e o transporte destes para a planta via *Agrobacterium* irá futuramente induzir a expressão de um hpRNA específico dentro da célula vegetal e, conseqüentemente a formação de siRNAs. Assim, espera-se obter plantas de morango transgênicas que apresentem função nula ou reduzida do receptor de etileno *FaETR1*, podendo este ser usado como modelo de estudos no entendimento do papel do etileno na maturação destes frutos, bem como contribuir com a elucidação da interação hormonal que ocorre durante a maturação.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos e financiamento do projeto e aos Doutores Francisco José Lima Aragão, pesquisador da EMBRAPA\ Cenargen e Dr. Thor Vinicius Martins Fajardo, pesquisador da EMBRAPA Uva e Vinho, que gentilmente forneceram os plasmídeos pKANNIBAL e pCAMBIA 3301 para a realização deste trabalho.

CAPITULO II – Estabelecimento de um Eficiente Sistema de Regeneração e Determinação da Sensibilidade aos Agentes Seletivos Canamicina e Glufosinato de Amônio para as Cultivares Camiño Real e Festival de *Fragaria x ananassa*.

Resumo - O morango comercial é um fruto poliploide de elevado valor comercial, entretanto seu melhoramento genético convencional é prejudicado pela sua ploidia, requerendo o uso de técnicas de engenharia genética e biotecnologia para melhoramentos pontuais mais eficientes. O sucesso da transformação genética é grandemente dependente da eficiente recuperação e seleção do material transformado. Na recuperação das plantas, a organogenese depende da concentração de reguladores de crescimento presente no meio de cultivo, e esta tende a variar de acordo com a fonte de explante e a cultivar utilizada. Bem como, na seleção das plantas transformadas, o uso de agentes seletivos como antibióticos ou herbicidas, deve ter sua concentração previamente testada e ajustada de acordo com a cultivar e o tipo de explante utilizados. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi testar diferentes concentrações dos reguladores de crescimento TDZ (Thidiazuron) e AIB (Ácido Indolbutírico) adicionadas ao meio básico MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) e diferentes fontes de explante (discos foliares e segmentos peciolares) para regeneração de brotos das cvs. Camiño Real e Festival. Como resultado, foi observado que 2,0mg\L de TDZ + 0,1mg\L de AIB é a melhor combinação para a regeneração de brotos de morangueiro da cv Camiño Real enquanto que 2,5mg\L de TDZ + 0,1mg\L de AIB é a melhor combinação para a regeneração de brotos da cultivar Festival. Utilizando estes resultados, também se objetivou testar doses dos agentes seletivos canamicina, um tipo de antibiótico e Glufosinato de amônia, um tipo de herbicida a fim de definir a menor dose eficiente na inibição da regeneração dos brotos de morangueiro. Como resultado foi observado a total inibição de brotos com 10 e 8mg\L de canamicina, correspondendo respectivamente às cultivares Camiño Real e Festival. Já para o agente seletivo Glufosinato de amônia, a sensibilidade observada foi muito mais expressiva, sendo que para a cultivar Camiño Real mesmo a menor dose testada (0,1 mg\L de glufosinato) levou a completa inibição da resposta organogenética. Enquanto que para a cultivar Festival a completa inibição da organogenese foi observada com 0,3 mg\L de glufosinato.

Palavras-chave - Cultura de Tecidos, Agentes seletivos, *Fragaria ananassa*.

Abstract - The commercial strawberry is a polyploid result of high commercial value, however the conventional breeding of this type of fruit is precisely hampered by ploidy, requiring the use of techniques of genetic engineering and biotechnology for more efficient specific improvements. The success of the genetic transformation of strawberry is greatly dependent on the efficient retrieval and selection of the processed material. In the recovery of plants, organogenesis is dependent on the concentration of this growth regulators in the culture medium, and this tends to vary according to the source of explant and cultivar. As well as the selection of transformed plants, the use of selective agents such as antibiotics or herbicides should have a concentration previously tested and adjusted according to cultivar and type of explant used. In this sense the objective of this study was to test different concentrations of TDZ (Thidiazuron) and IBA (Indolbutyric acid) added to the basic medium MS (Murashigue; Skoog, 1962) and different sources of explant (leaf discs and petiole segments) for regeneration buds of cvs. Camino Real and Festival. As a result, it was observed that 2.0 mg/L TDZ + 0.1mg/L IBA is the best combination for the regeneration of shoots strawberry cv Camino Real while 2.5 mg/L + 0 TDZ , 1 mg/L IBA is the best combination for shoot regeneration of cultivar Festival. Using these results, it is also aimed to test doses of the selective agent kanamycin, a kind of antibiotic and glufosinate ammonium, a type herbicide in order to determine the smallest effective dose in inhibition of the regeneration of shoots strawberry. As a result total inhibition was observed with 10 shoots and 8 mg/L kanamycin, respectively corresponding to cultivars Camino Real Festival. As for the selective agent glufosinate ammonium, the observed sensitivity was much more significant, and for the farming Camino Real even the lowest dose tested (0.1 mg L-glufosinate 1) led to complete inhibition of organogenesis response. While for cultivating Festival this result was demonstrated with 0.3 mg/L of glufosinate.

Keywords – Tissue Culture, Selective Agents, *Fragaria ananassa*.

6. INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* L. Duch) é uma planta octaplóide ($2n = 8x = 56$), com frutos de padrão de maturação não-climatérico, altamente valorizado como cultura pelo sabor e qualidade nutritiva de seus frutos (SONG et al., 2009). Todavia, sofre com a considerável perda de firmeza ao longo do amadurecimento, refletindo em reduzida vida de prateleira e afetando a comercialização (BAPAT et al., 2010). Assim, estudos de engenharia genética visando melhorias na firmeza dos frutos vêm sendo realizados, tal qual a supressão de enzimas que degradam a parede celular como pectato liase (JIMENEZ-BERMUDEZ et al., 2002), endo- β -(1,4)-glucanases (PALOMER et al., 2006) e poligalacturonases - FaPG1 e FaPG2 (QUESADA et al., 2009). Além disso, estudos relacionados diretamente ao entendimento da maturação destes frutos, baseados no papel do etileno neste processo também têm sido bastante explorados (SUN et al., 2013; VILLARREAL et al., 2010; TRAINOTTI et al., 2005).

Se tratando de um híbrido octaplóide, o processo de melhoramento de morangueiro com características agronômicas desejáveis através de programas tradicionais de reprodução é muito ineficiente, demorado e demanda muita mão de obra. Entretanto, aplicações de engenharia genética e de biotecnologia no morangueiro são cada vez mais utilizadas no melhoramento e na expansão da base de germoplasma disponível (QIN et al., 2008). Dentre estas técnicas, a transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* é um método eficaz e amplamente utilizado nesta cultura (DEBNATH; TEIXEIRA DA SILVA, 2007); entretanto, que não depende apenas de um apropriado protocolo de transformação, mas também do estabelecimento prévio de um eficiente sistema de recuperação e identificação das plantas modificadas (QIN et al., 2011).

Baseada na totipotência das células vegetais (BISWAS et al., 2010), a organogênese consiste na diferenciação de órgãos a partir de fragmentos de tecidos, devido a combinações entre níveis e tipos de auxina e citocinina no meio de cultivo (HUSAINI et al., 2011; MOTTE et al., 2013), agregando as capacidades de divisão e expansão celular exercidas por estes reguladores (GASPAR et al., 2003). Entretanto a resposta organogenética tende a variar de acordo com genótipo, fonte de explante, tipos e concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultivo (ZAKARIA et al., 2013; HUSAINI et al., 2011).

Segundo Haddadi et al. (2010), na regeneração de brotos de morangueiro, as citocininas devem estar em maior concentração do que as auxinas, pois desempenham um maior protagonismo no controle da multiplicação de brotos. Dentre as citocininas mais

utilizadas, estão 6- benzilamino-purina (BAP) e tidiazuron (TDZ) - mais recentemente empregada - podendo estas, serem utilizadas de forma isolada ou em combinação com auxinas, como ácido indol - butírico (AIB) (LANDI; MEZZETTI, 2006) para melhorar a taxa de regeneração e o número de brotos por explante (MURTIL et al., 2012).

Outro fator importante na organogênese é a escolha da fonte de explante utilizada. Para a regeneração de brotos de morangueiro são citadas as mais diversas fontes de explante, como sépalas, calos e embriões somáticos, entretanto com destaque para folhas e pecíolos que geralmente apresentam as maiores taxas de regeneração, embora as respostas possam variar de acordo com o genótipo utilizado (HUSAINI et al., 2011).

Além da regeneração, a identificação e seleção das plantas transformadas é de suma importância, considerando que a eficiência da transformação genética está associada ao sistema de seleção dos transformantes (SILVA et al., 2010). A inserção de genes marcadores que induzem à resistência á substâncias como antibióticos ou herbicidas funciona como agente de seleção inibindo o desenvolvimento de brotos cuja transformação não foi eficiente (ABADAL-AZIZ, 2006; KARAMI et al., 2009; QIN et al., 2011).

Muitos métodos de transformação utilizam o gene *nptII*, que confere resistência aos antibióticos do grupo aminoglicosídios (Neomicina, Canamicina e Gentamicina) às células transformadas (MARCELLINO et al., 2007; QIN et al., 2011; PANTAZIS et al., 2013). Entretanto o uso do gene *Bar*, que confere resistência à herbicidas a base de glufosinato de amônio também tem sido relatado com sucesso na cultura do morangueiro (ZHANG et al., 2001; FOLTA et al., 2006 b). Todavia, o uso de agentes seletivos pode ter efeito negativo sobre a indução de calos e a capacidade de regeneração dos explantes, variando de acordo com a concentração, espécies, cultivares e tipos de explante utilizados (KARAMI et al., 2009; ZHANG et al., 2001).

Neste contexto, ressalta-se a importância do ajuste prévio de protocolos de regeneração e seleção de plantas de acordo com a cultivar e o tipo de explante utilizado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar explantes foliares e peciolares de morango submetidos à diferentes concentrações de TDZ e AIB visando a máxima regeneração de brotos *in vitro*, seguido de testes com diferentes concentrações do antibiótico canamicina e do herbicida Finale[®] (i.a. Glufosinato de amônia) adicionada ao meio de regeneração, a fim de estabelecer a menor concentração capaz de inibir a regeneração de plantas não transformadas de morangueiro das cultivares Caminõ Real e Festival.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Experimento I – Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e Ácido Indolbutírico (AIB) na organogênese de plantas de morangueiro a partir de explantes foliares e peciolares.

Plântulas de morangueiro das cvs. Camiño Real e Festival foram cultivadas *in vitro* através da germinação de aquênios frescos em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais. Após o estabelecimento das plântulas, estas foram segmentadas em explantes foliares de aproximadamente 1cm² e explantes peciolares de aproximadamente 1cm de comprimento. Separadamente os explantes foram submetidos à organogênese em diferentes meios de regeneração compostos do meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e acrescido de diferentes combinações dos reguladores de crescimento Thidiazuron (TDZ) e Ácido Indolbutírico (AIB).

Para a cv. Camiño Real foram testadas as concentrações de 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹ de TDZ, combinadas com 0,1; 0,3 e 0,5 mg L⁻¹ de AIB, correspondendo à nove diferentes tratamentos, conduzidos em delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 3x3. Já para a cv. Festival foram testadas as concentrações de 2,0; 2,5 e 3,0 mg L⁻¹ de TDZ combinadas com 0,1 e 0,3 mg L⁻¹ de AIB, correspondendo à seis diferentes tratamentos, conduzidos em delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 3x2. Para ambas cultivares, cada tratamento foi composto por cinco repetições (placas de petri), e estas compostas por seis explantes cada.

As placas de Petri com os respectivos meios de cultura foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 °C $\pm$ 2 e fotoperíodo de 16 horas sob intensidade de 2000 μ M m⁻² s⁻¹. Após 45 dias foi realizada a contagem do número de gemas e brotações por explante e em seguida as brotações foram transferidas para frascos contendo o meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, sem adição de reguladores de crescimento, para o enraizamento. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey á 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

7.2 Experimento II – Sensibilidade da organogênese foliar do morangueiro aos agentes seletivos Canamicina e Glufosinato de amônia.

A partir dos resultados do experimento I, observou-se que, utilizando explantes foliares, para a cultivar Camino Real o meio básico de maior regeneração foi composto de MS + 2,0mg/L de TDZ + 0,1mg/L de AIB, enquanto que para a cultivar Festival este foi composto por MS + 2,5mg/L de TDZ + 0,1mg/L de AIB.

Em seguida concentrações crescentes do antibiótico Canamicina (Kan) foram adicionadas ao meio de melhor resposta a regeneração de brotos organogênicos de ambas cultivares, a fim de obter a menor concentração de Canamicina capaz de inibir o desenvolvimento de plantas não transformadas. Primeiramente foram testadas as concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50mg/L de Canamicina, entretanto, com a necessidade de um ajuste de dose, num segundo experimento as doses testadas foram reduzidas à 0, 2, 4, 6, 8 e 10mg/L de Canamicina.

Paralelamente também foram testadas concentrações crescentes do herbicida Finale[®] (i.e Glufosinato de Amônia) também com o objetivo de obter a menor concentração de herbicida capaz de inibir o desenvolvimento de plantas não transformadas. Primeiramente foram testadas as concentrações de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/L de ingrediente ativo. Com a necessidade de ajuste de dose foram testadas as concentrações de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 e 3mg/L de ingrediente ativo e ainda, em seguida as concentrações de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5mg/L de ingrediente ativo.

A metodologia em si segue o descrito para o experimento I. O experimento foi avaliado em delineamento inteiramente aleatorizado em esquema unifatorial. Após 45 dias foi realizada a contagem do número de gemas e brotações por explante, e em seguida as brotações foram transferidas para frascos contendo o meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais para o enraizamento. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística da variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro ($p \leq 0,05$) com o auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2009).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I - Efeito de combinações de Thidiazuron (TDZ) e Ácido Indolbutírico (AIB) na organogênese de plantas de morangueiro a partir de explantes foliares e peciolares.

Para ambas cultivares, na utilização de explantes peciolares de morangueiro, houve apenas um reduzido número de brotos, com morfologia quimérica apresentando folhas retorcidas, deformadas, sem formação de pecíolos e com coloração esverdeada à avermelhada (figura 17A). Além disso, não houve formação de gemas, e apenas foi observada formação de calos na região de corte do explante, também em pequena quantidade (figura 17B).



Figura 17. Explantes peciolares de morangueiro com formação de broto quimérico, sem forma definida de folhas e pecíolos (A) e formação de calos, em pequena quantidade e apenas na região do corte (B). Explante foliar com regeneração de brotos completos capazes de regenerar uma nova planta de morangueiro (C).

A ação do TDZ na formação de calos em espécies lenhosas já foi observada em muitas espécies, e esse regulador é considerado um excelente estimulante para a formação de calos (HUETTEMAN; PREECE, 1993), entretanto, a indução de calos em morangueiro, espécie não lenhosa é um resultado interessante, e que provavelmente também esteja associado a presença do AIB. Contudo, apesar da eficiência morfológica do TDZ para a morfogênese, ele também pode apresentar resultados negativos, tais como a oxidação dos explantes devido a indução da biossíntese do etileno (CARVALHO et al., 2011). O que sugere a utilização de outras citocininas para promover a organogênese em explantes peciolares de morangueiro.

Todavia na utilização de explantes foliares, para ambas cultivares foi observado desenvolvimento de gemas e brotos viáveis, capazes de regenerar uma planta *in vitro* por completo (figura 17C). Segundo Husainiet al. (2011), embora a maioria dos trabalhos sobre regeneração de morangueiro utilizem discos foliares e pecíolos como explantes, é conhecido que tecido foliar tem a maior capacidade de regeneração comparado aos outros tecidos desta

cultura, de forma que as taxas de regeneração de brotos usando este explante são geralmente elevados, embora muito genótipo dependente.

É importante ressaltar que não houve interação significativa entre concentrações de TDZ e AIB e que portanto, a comparação de médias foi realizada de forma unifatorial considerando-se o tratamento como um todo e não sua combinação. Assim, para a cv. Camiño Real, utilizando explantes foliares, o maior número de gemas foi obtido no tratamento T5 ($1,5\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,3\text{ mg L}^{-1}$ AIB), com uma média de 3,19 gemas por explante, entretanto, diferindo significativamente apenas do tratamento T9 ($2,0\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,5\text{ mg L}^{-1}$ AIB). Já para o número de brotos, o tratamento T7 ($2,0\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,1\text{ mg L}^{-1}$ AIB) apresentou o melhor resultado, em torno de 2,3 brotos por explante (Tabela 3).

Tabela 3. Número de gemas e brotos obtidos por organogênese de explante foliar de morangueiro “Camiño Real” a partir de diferentes combinações de TDZ e AIB.

Tratamento	Combinação	Gemas	Brotos
T1	$1,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,1\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,42 AB	0,71 BC
T2	$1,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,3\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,31 AB	1,16 AB
T3	$1,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,5\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,35 AB	0,75 BC
T4	$1,5\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,1\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,27 AB	1,46 AB
T5	$1,5\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,3\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	3,19 A	1,41 AB
T6	$1,5\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,5\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	1,92 AB	1,04 BC
T7	$2,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,1\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,44 AB	2,29 A
T8	$2,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,3\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	2,44AB	1,17 AB
T9	$2,0\text{mg}\backslash\text{L}$ TDZ + $0,5\text{ mg}\backslash\text{L}$ AIB	0,92 B	0,17 C
CV(%)		45,3	71,8

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a cv. Festival, o maior número de gemas foi obtido nos tratamentos T1 ($2,0\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,1\text{ mg L}^{-1}$ AIB) e T2 ($2,0\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,3\text{ mg L}^{-1}$ AIB), com média de 5,7 e 4,6 gemas por explante, respectivamente. Já o maior número de brotos por explante foi obtido nos tratamentos T3 ($2,5\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,1\text{ mg L}^{-1}$ AIB) e T4 ($2,5\text{mg L}^{-1}$ TDZ + $0,3\text{ mg L}^{-1}$ AIB) com 2,06 e 1,6 brotos por explante, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Número de gemas e brotos obtidos por organogênese de explante foliar de morangueiro “Festival” a partir de diferentes combinações de TDZ e AIB.

Tratamento	Combinação	Gemas	Brotos
T1	2,0mg\L TDZ + 0,1 mg\L AIB	5,66 A	0,87 BC
T2	2,0mg\L TDZ + 0,3 mg\L AIB	4,60 AB	1,33 B
T3	2,5mg\L TDZ + 0,1 mg\L AIB	3,43 B	2,06 A
T4	2,5mg\L TDZ + 0,3 mg\L AIB	1,73 BC	1,60 AB
T5	3,0mg\L TDZ + 0,1 mg\L AIB	1,43 C	0,21 C
T6	3,0mg\L TDZ + 0,3 mg\L AIB	1,81 BC	0,75 BC
CV(%)		31,06	31,25

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados confirmam que no morangueiro a resposta à organogênese varia de acordo com os reguladores de crescimento presentes no meio de cultivo, sendo este critério dependente da cultivar e do tipo de explante utilizado, bem como descrito por Husaini et al. (2011), Haddadi et al. (2010) e Landi e Mezzetti (2006). Além disso, é possível observar que para ambas as cultivares estudadas, embora a máxima obtenção de brotos fique em torno de 2 brotos/explantes, a cv. Camiño Real atinge este resultado com uma concentração pouco menor de TDZ do que a cv. Festival, demonstrando uma linha tênue que separa os níveis ideais de citocinina destas cultivares. Para a cv. Festival, também é possível observar que conforme a concentração de TDZ no meio de cultivo se elevou apenas $0,5\text{mg L}^{-1}$, houve significativa redução na formação de brotos, o que segundo Haddadi et al. (2010), pode estar relacionado com a elevada estabilidade do TDZ no tecido da planta, aumentando a concentração de citocinina endógena e inibindo a ação da citocinina oxidase, podendo causar redução do número de brotos pelo excesso deste regulador no tecido.

Observa-se também, que para ambas cultivares, os níveis de AIB no meio de cultura foram bastante reduzidos, o que pode ser explicado pelo fato de que o TDZ é uma substância sintética, com ação semelhante à citocininas e também auxinas (MURTHY et al., 1998), o que possivelmente reduz a necessidade da presença desta última no meio de cultivo. Entretanto, segundo Murttil et al. (2012), a presença de uma auxina, como AIB, parece ser um fator importante que influencia o desempenho das plântulas, melhorando significativamente o desenvolvimento da parte aérea e o enraizamento de brotos de morangueiro *in vitro*, não devendo portanto deixarem de ser utilizadas em complemento ao TDZ.

Experimento II – Sensibilidade da organogênese foliar do morangueiro aos agentes seletivos Canamicina e Glufosinato de amônia.

Suplementando os meios de maior indução de brotos de morangueiro das cvs. Camiño Real e Festival com concentrações crescentes do antibiótico canamicina, foi possível observar variação de resposta entre as cultivares estudadas e aquelas citadas na literatura.

No morangueiro, bem como para regeneração, a sensibilidade à antibióticos também varia de acordo com a cultivar e o tipo de explante utilizado, entretanto seus efeitos sobre a morfogênese, crescimento da parte aérea e mudanças fisiológicas ainda são pouco relatados (QIN et al., 2011). Em morango comercial (*Fragaria x ananassa* L. Duch), as concentrações de canamicina recomendadas variam em torno de 25mg L^{-1} para a cv. Toyonaka (QIN et al., 2011) à 50mg L^{-1} para a cv. Chandler (HUSAINI, 2010). Todavia, para as cvs. Festival e Camiño Real, estudos preliminares (dados não demonstrados) com concentrações de 0, 10, 20, 30, 40 e 50mg L^{-1} mostraram total inibição da formação de calos, gemas e brotos em discos foliares de morangueiro cv. Camiño Real e Festival (Figura 2), não sendo possível estabelecer estatisticamente uma curva de inibição com estas concentrações.

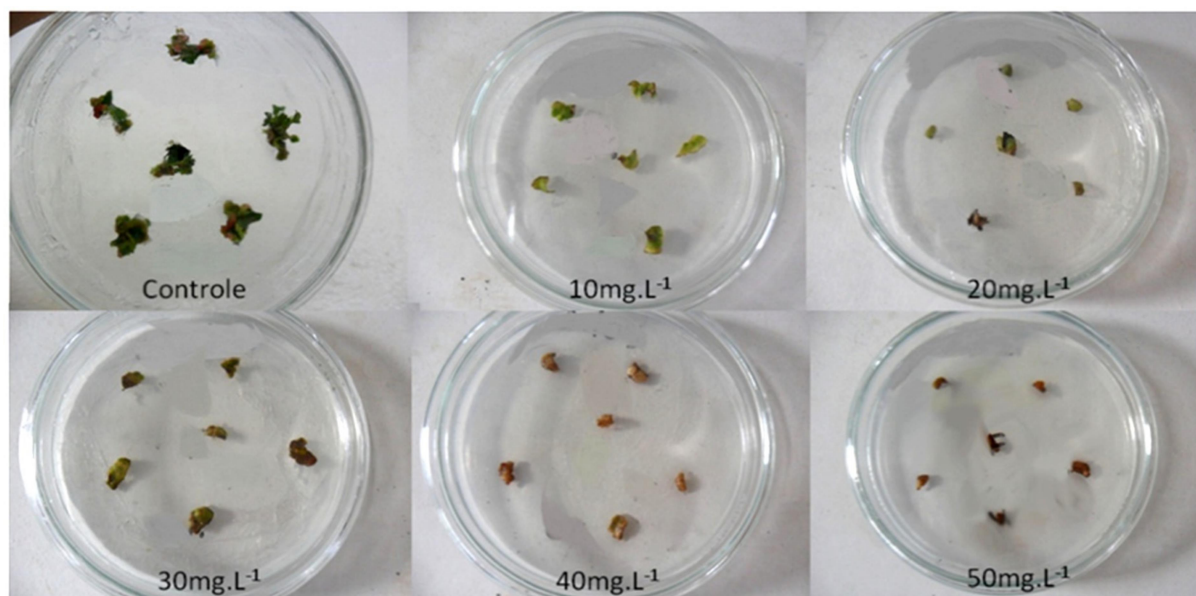


Figura 18. Explantes foliares de morangueiro submetidos à concentrações crescente (0, 10, 20, 30, 40 e 50mg L^{-1}) de canamicina.

Entretanto, reduzindo os níveis de canamicina para 0, 2, 4, 6, 8 e 10mg L^{-1} (presente trabalho), foi possível observar uma curva de inibição onde conforme o aumento da concentração de canamicina, a presença de gemas e regeneração de brotos foi significativamente inibida, o que está de acordo com QIN et al. (2011), culminando em total inibição da formação de calos, gemas e brotos com 10mg L^{-1} para ambas as cultivares (Figura

3 e Figura 4). Além disso, observamos também necrose crescente de acordo com a dose de canamicina utilizada, possivelmente devido ao vazamento de eletrólitos e desencadeamento de processos enzimáticos ativos (PANTAZIS et al., 2013).

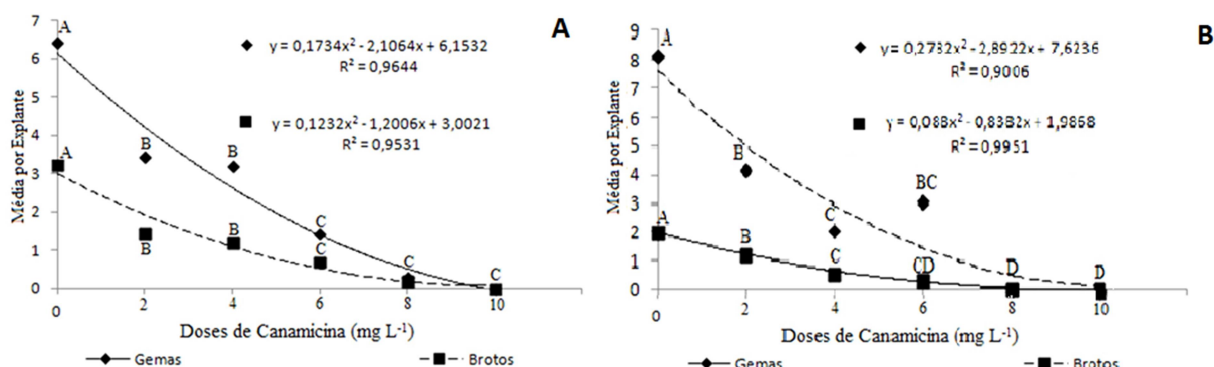


Gráfico 1. A - Número de gemas e brotos obtidos em explante foliar de morangueiro "Camiño Real", submetidos a concentrações crescentes do antibiótico canamicina. B - Número de gemas e brotos obtidos em explante foliar de morangueiro "Festival", submetidos a concentrações crescentes do antibiótico canamicina. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora a produção de calos e até mesmo gemas e brotos seja seguida de necrose em concentrações mais baixas de canamicina (a partir de 6mg L⁻¹ para Camiño Real e 4mg L⁻¹ para Festival), inibindo da mesma forma a regeneração de novas plantas, é conhecido que a seleção de plantas transformadas através de resistência conferida por genes marcadores pode apresentar regeneração de brotos não transgênicos, por razões ainda desconhecidas (PANTAZIS et al., 2013). Todavia, concentrações elevadas podem influenciar negativamente a organogênese de plantas transformadas, indicando que se deve utilizar a mínima dose eficiente na inibição da regeneração de gemas e brotos.

Utilizando como agente seletivo o glufosinato de amônia, uma fosfinotricina sintética, Zhang et al., (2001) relata o uso de 10 mg/L de glufosinato de amônia para completa inibição da regeneração de brotos de morangueiro *in vitro*, enquanto que Folta et al., 2006 b, indica que com apenas 1 mg/L de glufosinato de amônia ocorre a total inibição da regeneração de brotos de morangueiro *in vitro*.

No presente trabalho, utilizando concentrações crescentes de 0, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/L de glufosinato de amônio, foi observada completa inibição da organogênese foliar das cultivares Camiño Real e Festival já com 3 mg/L de glufosinato de amônio. Da mesma forma, testes consecutivos utilizando as concentrações de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 e 3mg/L de glufosinato

de amônia, também demonstraram total inibição da organogênese foliar de ambas as cultivares já na primeira dose, no caso 0,5 mg/L de glufosinato de amônia (dados não demonstrados). Todavia, testando-se concentrações de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5mg/L de glufosinato de amônia, foi possível observar um gradiente de inibição na organogênese foliar de morangueiro da cultivar Festival (Figura 19).

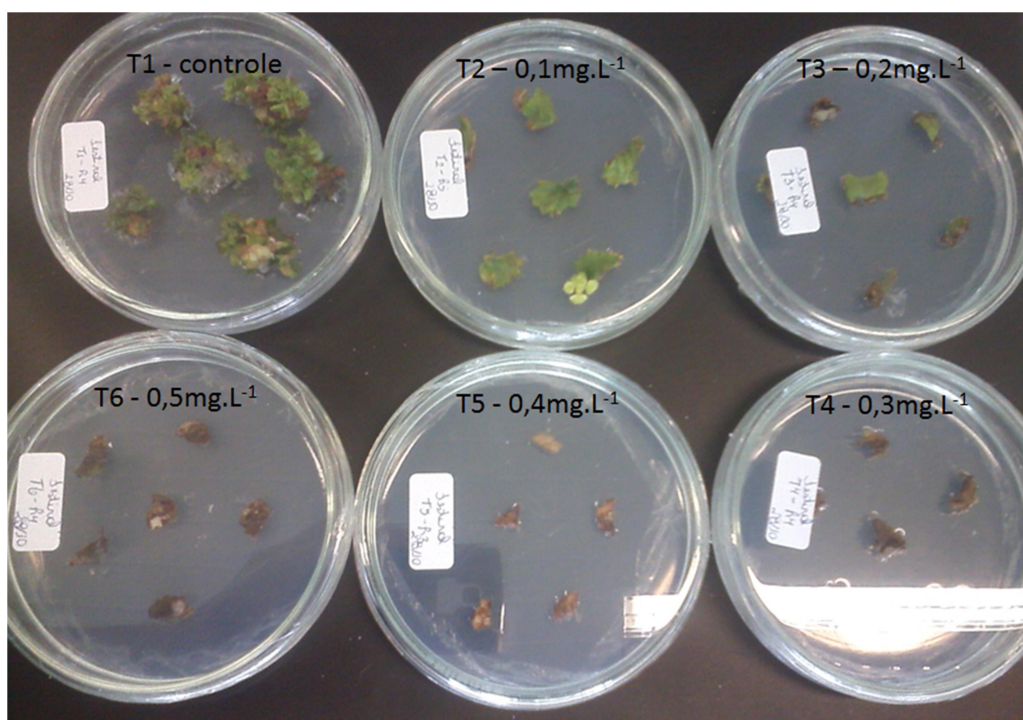


Figura 19. Explantes foliares de morangueiro da cultivar Festival submetidos à concentrações crescente (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5mg/L) de glufosinato de amônia.

Como pode ser observado no gráfico 2, para a cultivar de morangueiro Festival, a adição de apenas 0,1mg/L de glufosinato de amônio causou redução de mais de 50% da regeneração de brotos enquanto que a adição de 0,3mg/L causou completa inibição.

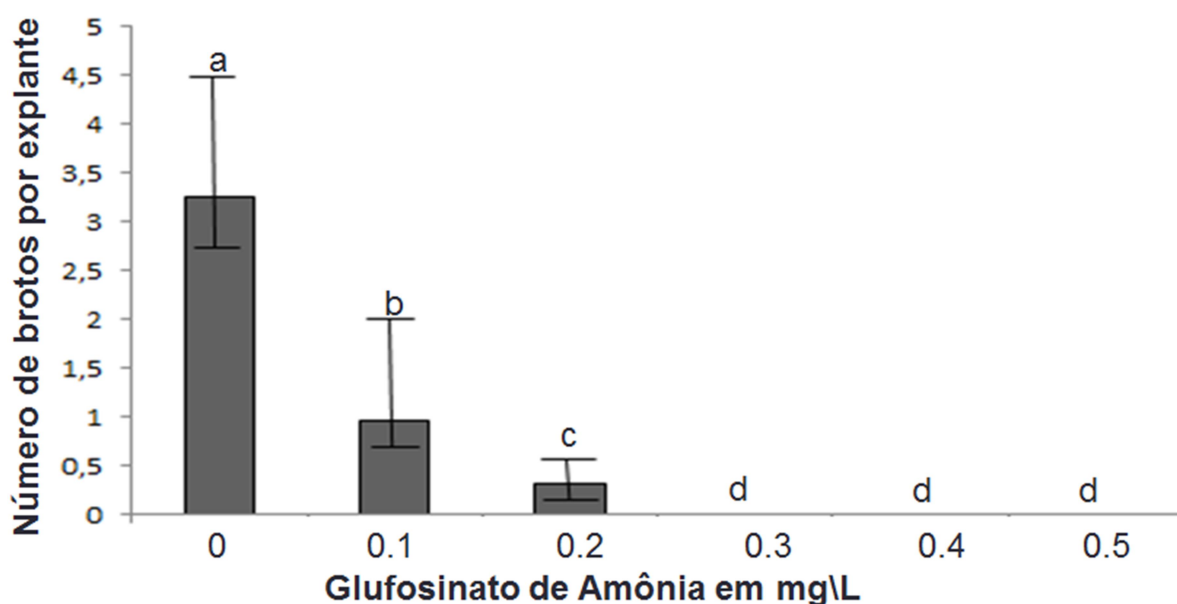


Gráfico 2. Número de brotos obtidos em explante foliar de morangueiro “Festival”, submetidos a concentrações crescentes de glufosinato de amônio aplicado a partir do herbicida Finale®. As barras de erro indicam o padrão de erros a partir da média (Ponta Grossa, 2014)

Todavia, não foi possível avaliar a sensibilidade da cultivar de morangueiro Camiño Real, pois, foi observada completa inibição da organogênese já com 0,1mg/L de glufosinato de amônia, evidenciando uma alta sensibilidade desta cultivar à este agente seletivo (dados não demonstrados).

9. CONCLUSÕES

O morango cultivado (*Fragaria ananassa*) possui especificidade tanto de genótipo quanto de tipo de explante em sua resposta à organogênese. Embora explantes peciulares sejam amplamente utilizados nesta cultura, para as cultivares Camiño Real e Festival, este não respondeu bem às condições de estudo, sendo recomendado para tais condições apenas explantes foliares. A concentração dos reguladores de crescimento que geraram máxima regeneração de brotos também variou entre as cultivares. Para cv Camiño Real recomenda-se 2,0mg/L TDZ + 0,1 mg/L AIB para regeneração enquanto que para a cv Festival recomenda-se 2,5mg/L TDZ + 0,1 mg/L AIB para regeneração. Com relação a sensibilidade aos agentes seletivos canamicina e glufosinato de amônia, para a cultivar Festival a completa inibição da organogênese, foi observada com 8mg/L de canamicina e 0,3mg/L de glufosinato de amônia, enquanto que para a cultivar Camiño real podemos recomendar 10mg/L de canamicina. Para esta cultivar não foi possível estabelecer um gradiente de inibição quando da utilização do

agente seletivo glufosinato de amônia, pois observamos completa inibição da organogênese foliar já com 0,1mg/L de glufosinato de amônia.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela disponibilização da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDAL-AZIZ, S. A.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Evidence of Frequent Integration of Non-T-DNA Vector Backbone Sequences in Transgenic Strawberry Plant, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 6, p. 508–510, 2006.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i prodotti Brasiliani mirando all'esportazione in Europa. *Frutticoltura (Bologna)*, v. 69, p. 60-65, 2007.

AYUB, R.; GUIS, M.; BEN AMOR, M.; GILLOT, L.; ROUSTAN, J. P.; LATCHÉ, A.; BOUZAYEN, M.; PECH, J. C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits, *Nature Biotechnology*, v.14, n.7, p.862-866, 1996.

BAPAT, V. A.; TRIVEDI, P. K.; GHOSH, A.; SANE, V. A. GANAPATHI, T. R.; NATH, P. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene, *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 94–107, 2010.

BARCELÓ, M.; EL-MANSOURI, I.; MERCADO, J. A.; QUESADA, M. A.; ALFARO, F. P. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 54, n. 1, p. 29-36, 1998.

BARRY, C. S., GIOVANNONI, J. J. Ethylene and Fruit Ripening, *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 26, p. 143–159, 2007.

BAULCOMBE, D. RNA Silencing in plants, *Nature Biotechnology*, v. 43, p. 356 – 363, 2004.

BEYER, P.; AL BABILI, S.; YE, X.; LUCCA, P.; SHAUB, P.; WELSCH, R.; POTRYCUS, I. Golden rice: introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency, *The Journal of Nutrition*, v. 132, n. 3, p.506-510, 2002.

BISSON, M. M. A.; BLECKMANN, A.; ALLEKOTTE, S.; GROTH, G. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1, *Biochemical Journal*, v. 424, p. 1-6, 2009.

BISWAS, M. K. et al. Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria sp.*) clones. *Turk Journal Biology*, v. 34, p. 75 –80, 2010

BLEECKER, A. B.; ESTELLE, M. A.; SOMERVILLE, C.; KENDE, H. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*, *Science*, v. 241, p. 1086–1089, 1988.

BONFIM, K.; FARIA, J. C.; NOGUEIRA, E. O. P. L.; MENDES, E. A.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*), *Molecular Plant Microbre Interactions*, v. 20, n. 6, p. 717–726, 2007.

CANCEL, J. C.; LARSEN, P. B. Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, v. 129, p. 1557–1567, 2002.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. Pós-Colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: UFLA, 785p, 2005.

CONTERAS-VERGARA, C. A.; STEPHENS-CAMACHO, N. A.; YEPIZ-PLASCENCIA,

CZARNY, J. C.; GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants, *Biotechnology Advances*, v.24, p. 410–419, 2006.

DEBNATH, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Strawberry Culture *In vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology, *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2007.

DYKXHOORN, D. M.; NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. Killing the Messenger: Short RNAs that silence gene expression, *Nature Reviews*, v. 4, p. 457–467, 2003.

FAO 2011, online <https://www.fao.org.br/>. Acesso em: 20 de dezembro de 2014.

FOLTA, K. M.; DHINGRA, A. Invited review: Transformation of strawberry: The basis for translational genomics in rosaceae, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 42, p.482–490, 2006.

FOLTA, K. M.; DHINGRA, A.; HOWARD, L.; STEWART, P. J.; CHANDLER, C. K. Characterization of LF9, an octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation, *Planta Journal*, v. 224, p. 1058–1067, 2006. b.

G.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; ARVIZU-FLORES, A. A.; SANCHEZ-SANCHEZ, E.; ISLAS-OSUNA, M.A. Cloning and expression of ethylene receptor ERS1 at various developmental and ripening stages of mango fruit, *Genetics and Molecular Research*, v.11, n. 4, p. 4081–4092, 2012.

GAO, Z.; WEN, C. K.; BINDER, B. M.; CHEN, Y. F.; CHANG, J.; CHIANG, Y. H.; KERRIS, R. J III.; CHANG, C.; SCHALLER, G. E. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 23801–23810, 2008.

GASPAR, T. H.; KEVERS, C.; FAIVRE-RAMPANT, O.; CRE` VECOEUR, M.; PENEL, C. L.; GREPPIN, H.; DOMMES, J. Changing Concepts in Plant Hormone Action, *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 39, n. 2, p. 85–106, 2003.

GIOVANNONI, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening, *The Plant Cell*, v. 16, p. 170–180, 2004.

GIOVANNONI, J. J. Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 52, p. 725–49, 2001.

HADDADI, F.; AZIZ, M. A.; SALEH, G.; RASHID, A. A.; KAMALADINI, H. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from *In vitro* Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine, *Hort Science*, v. 45, n. 3, p. 453–456, 2010.

HALL, B. P.; SHAKEEL, S. N.; AMIR, M.; HAQ, N. U.; QU, X.; SCHALLER, G. E. Histidine Kinase Activity of the Ethylene Receptor ETR1 Facilitates the Ethylene Response in Arabidopsis, *Plant Physiology*, v. 159, p. 682–695, 2012.

HALL, B. P.; SHAKEEL, S. N.; SCHALLER, G. E. Ethylene Receptors: Ethylene Perception and Signal Transduction, *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 26, p. 118–130, 2007.

HAMILTON, A.; LYCETT, G.; GRIERSON, D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants, *Nature Biotechnology*, v. 346, p. 284–287, 1990.

HARMOKO, R.; FANATA, W. I. D.; YOO, J. Y.; KO, K. S.; RIM, Y. G.; UDDIN, M. N.; SISWOYO, T. A.; LEE, S. S.; KIM, D. Y.; LEE, S. Y.; LEE, K. O. RNA-Dependent RNA Polymerase 6 is Required for Efficient hp-RNA-Induced Gene Silencing in Plants, *Molecules and Cells*, v. 35, p. 202–209, 2013.

HELLIWELL, C.; WATERHOUSE, P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants, *Methods*, v. 30, p. 289–295, 2003.

HUSAINI, A. M. Pre- and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants, *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 1, p. 97–110, 2010.

HUSAINI, A. M.; MERCADO, J. A.; TEIXEIRA DA SILVA, J.; SCHAART, J. G. Review of Factors Affecting Organogenesis, Somatic Embryogenesis and Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Strawberry, *Genes, Genomes and Genomics*, v. 5, Edição especial – 1, p. 1–11, 2011.

IANNETTA, P. P. M.; LAARHOVENB, L.; MEDINA-ESCOBARC, N.; JAMESD, E. K.; MCMANUSE, M. T.; DEVIESA, H. V.; HARREN, F. J. M. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit, *Physiologia Plantarum*, v. 127, p. 247–259, 2006.

JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; REDONDO-NEVADO, J.; MUÑOZ-BLANCO, J.; CABALLERO, J. L.; LÓPEZ-ARANDA, J. M.; VALPUESTA, V.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A.; MERCADO, J. A. Manipulation of strawberry fruit ripening by antisense expression of pectate lyase gene, *Plant Physiology*, v. 128, p. 751–759, 2002.

JU, C.; YOON, G. M.; SHEMANSKYA, J. M.; LIN, D. Y. YANG, Z. I.; CHANG, J.; GARRETT, W. M.; KESSENBROCKD, M.; GROTH, G.; TUCKERE, M. L.; COOPER, B.; KIEBER, J. J.; CHANG, C. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis, PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 47, p. 19486–19491, 2012.

KARAMI, O; ESNA-ASHARI, M; KARIMI, K. G; AGHAVAIS, B. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: the role of host, Biologia Plantarum, v.53, n. 2, pg.201–212, 2009.

LACEY, R. F.; BINDER, B. M. How plants sense ethylene gas — The ethylene receptors, Journal of Inorganic Biochemistry, v. 133, p. 58–62, 2014.

LANDI, L.; MEZZETTI, B. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*, Plant Cell Reports, v.25, n. 4, p.281-288, 2006.

LEITE, J. P.; BARBOSA, E. G. G.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F. C.; PAGLIARINI, R. F.; CRUZ, A. S.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; GUIMARÃES, F. C. M.; YOSHIDA, T.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINOZAKI, K. Y.; DESIDÉRIO, J. A.; NEPOMUCENO, A. L. Overexpression of the activated form of the AtAREB1 gene (AtAREB1-QT) improves soybean responses to water deficit, Genetics and Molecular Research, v. 13, p. 6272-6286, 2014.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *In vitro* de Plantas**, Brasília, DF. EMBRAPA 2010.

MARCELLINO, L. H.; ROMANO, E.; GANDER, E. S. Identificação de Plantas Transgênicas. In: TORRES, A. C.; DUSI, A. N.; SANTOS, M. D. M. Transformação Genética de Plantas via Agrobacterium: Teoria e Prática. Brasília, DF: EmbrapaHortaliças, 2007. Cap. 3, p. 61-80.

MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M.; PRUSS, G. J.; VANCE, V. B. RNA-Based silencing strategies in plants, Current Opinion in Genetics & Development, v. 11, p. 221-227, 2001.

MERCHANTE, C.; VALLARINO, J. G.; OSORIO, S.; ARAGUEZ, I.; VILLARREAL, N.; ARIZA, M. T.; MARTÍNEZ, G. A.; MEDINA-ESCOBAR, N.; CIVELLO, M.; FERNIE, A. R. F.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in a organ-specific manner. Journal of Experimental Botany, v. 64, n. 14, p. 4421- 4439, 2013.

MOAZED, D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence, Nature, v. 457, n. 7228, p. 413–420, 2009.

MOTTE, H.; VEREECKE, D.; GEELEN, D. WERBROUCK, S. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration, Biotechnology Advances, v. 32, n. 1, p.107-121, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, v. 15, n. 3, p. 437-496, 1962.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.34, n. 4, p.267-275, 1998.

MURTIL, R. H.; DEBNATH, S. C.; YEOUNG, Y. R. Effect of high concentration of thidiazuron (TDZ) combined with 1H-indole-3-butanoic acid (IBA) on Albion strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivar plantlets induction, *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 81, p. 14696-14702, 2012.

NEHRA, N. S.; CHIBBAR, R. N.; KARTHA, K. K.; DATLA, R. S.; CROSBY, W.L.; STUSHNOFF, C. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system, *Plant Cell Report*, v. 9, n. 6, p. 293-298, 1990.

OELLER, P. W.; WONG, L. M.; TAYLOR, L. P.; PIKE, D. A.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, *Science*, v. 254, p. 427–439, 1991.

PALOMER, X.; LLOP-TOUS, I.; VENDRELL, M.; KRENS, F. A.; SCHAART, J. G.; BOONE, M. J.; VALK, H. V. D.; SALENTIJN, E. M. J. Antisense down-regulation of strawberry endo- β -(1, 4)-glucanase genes does not prevent fruit softening during ripening, *Plant Science*, v. 171, n. 5, p. 640-646, 2006.

PANTAZIS, C. J; FISK, S; MILLS, K; • FLINN, B. S; SHULAEV, V; VEILLEUX, R. E; DAN, YINGHUI. Development of an efficient transformation method by *Agrobacterium tumefaciens* and high throughput spray assay to identify transgenic plants for woodland strawberry (*Fragaria vesca*) using NPTII selection, *Plant Cell Report*, v. 32, n. 3, p. 329–337, 2013.

PECH, J. C.; PURGATTO, E.; BOUZAYEN, M.; LATCH'E, A. Ethylene and Fruit Ripening, *Annual Plant Reviews*, v. 44, p. 275-304, 2012.

QIN, Y. H.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.BI, J. H.; ZHANG, S. L.; HU, G. B. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics, *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 65, n. 1, p. 183–193, 2011.

QUESADA, M. A.; BLANCO-PORTALES, R.; POSÉ, S.; GARCÍA-GAGO, J. A.; JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; MUÑOZ-SERRANO, A. CABALLERO, J. L.; PLIEGO-ALFARO, F.; MERCADO, J. A.; MUÑOZ-BLANCO, J. Antisense down-regulation of the FaPG1 gene reveals na unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening, *Plant Physiology*, v. 150, n. 2, p. 1022-1032, 2009.

RICARDO, V. G.; COLL, Y.; CASTAGNARO, A.; RICCI, J. C. D. Transformation of a strawberry cultivar using a modiWed regeneration medium, *Hortscience*, v.38, p.277–280, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning, a Laboratory Manual. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHAKEEL, S. N.; WANG, X.; BINDER, B. M.; SCHALLER, G. E. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signaling roles in a receptor family, *AoB Plants*, v. 5, 2012.

SINHA, N., SIDHU, J., BARTA, J., WU, J., & CANO, M. P. Handbook of fruits and fruit processing. John Wiley & Sons, 2ed, 34p, 2012.

SMITH, N. A.; SINGH, P.; WANG, M.; STOUTJESDIJK, P. A.; GREEN, A. G.; WATERHOUSE, P. M. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature*, v. 407, p. 319-320, 2000.

SONG, C.; MA, J.; TANG, X.; ZHANG, Z.; ZHOU, P.; HOU, Z. Cloning of strawberry FaEtr2 gene and its plant expression vector construction for antisense RNA, *Frontiers of Agriculture in China*, v. 3, n. 1, p. 55–59, 2009.

SUN, J. H.; LUO, J. J.; TIAN, L.; LI, C. L.; XING, Y.; SHEN, Y. Y. New Evidence for the Role of Ethylene in Strawberry Fruit Ripening, *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 32, n. 3, p.461-470, 2013.

SYMONS, G. M.; CHUA, Y. J.; ROSS, J. J.; QUITTENDEN, L. J.; DAVIES, N. W.; REID, J. B. Hormonal changes during non-climacteric ripening in Strawberry, *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 2, p. 695–709, 2012.

TACHIBANA, K.; WATANABE, T.; SEKIZAWA, Y.; TAKEMATSU, T. Accumulation of ammonia in plant treated with bialaphos, *Journal of Pesticide Science*, v.11, p.33-37, 1986.

TANG, G.; GALILI, G.; ZHUANG, X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering, *Metabolomics*, v. 3, p.357–369, 2007.

THOMPSON, C. J.; MOVVA, N. R.; TIZARD, R.; CRAMERI, R.; DAVIES, J. E. LAUWEREYS, M.; BOTTERMAN, J. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*, *The EMBO Journal*, v. 6, n. 9, p. 2519–2523, 1987.

TIWARI, M.; SHARMA, D.; TRIVEDI, P. K. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives, *Plant Molecular Biology*, v. 86, p. 1- 18, 2014.

TRAINOTTI, L.; PAVANELLO, A.; CASADORO, G. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits, *Journal of Experimental Botany*, v. 56, n. 418, p. 2037–2046, 2005.

VILLARREAL, N. M.; BUSTAMANTE, C. A.; CIVELLO, P. M.; MARTÍNEZ, G. A. Effect of ethylene and 1-MCP treatments on strawberry fruit ripening, *Journal of Science Food Agriculture*, v.90, p. 683–689, 2010.

WATSON, J. M.; FUSARO, A. F.; WANG, M.; WATERHOUSE, P. M. RNA silencing platforms in plants, *FEBS Letters*, v. 579, p. 5982–5987, 2005.

WEN, X.; ZHANG, C.; JI, Y.; ZHAO, Q.; HE, W.; NA, F.; JIANG, L.; GUO, H. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus, *Cell Research*, v. 22, p. 1613-1616, 2012.

ZAKARIA, H.; HUSSEIN, G. M.; ABDEL-HADI, A. A.; ABDALLAH, N. A. Improved regeneration and transformation protocols for three strawberry cultivars, *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, v.5, n.1, p.4-3, 2013.

ZHANG, J.; YU, J.; WEN, C. An alternate route of ethylene receptor signaling, *Frontiers in Plant Science*, v. 5, n. 648, p. 1-6, 2014.

ZHU, Z.; GUO, H. Genetic Basis of Ethylene Perception and Signal Transduction in *Arabidopsis*, *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 7, p. 808-815, 2008.

ANEXOS

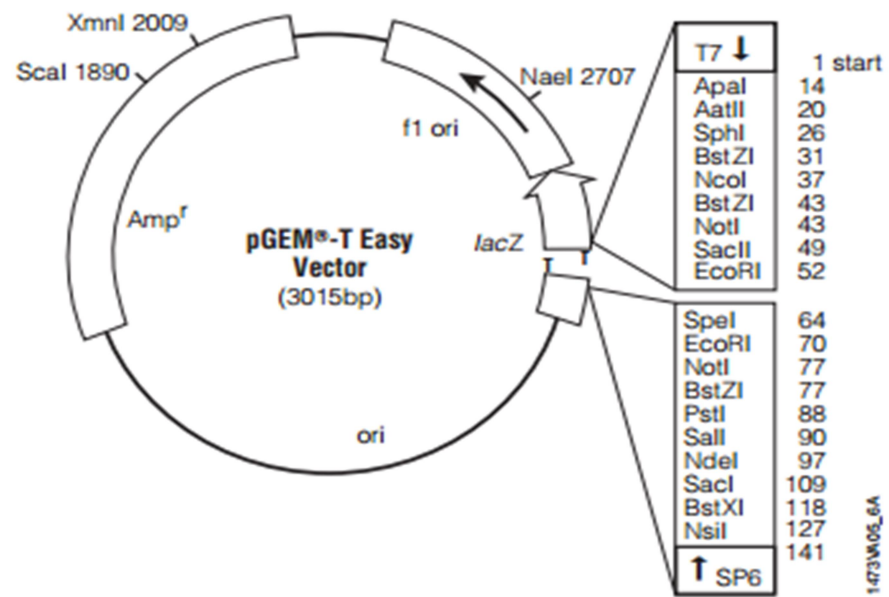


Figura 20. Mapa de restrição do plasmídeo de clonagem pGEM-T Easy

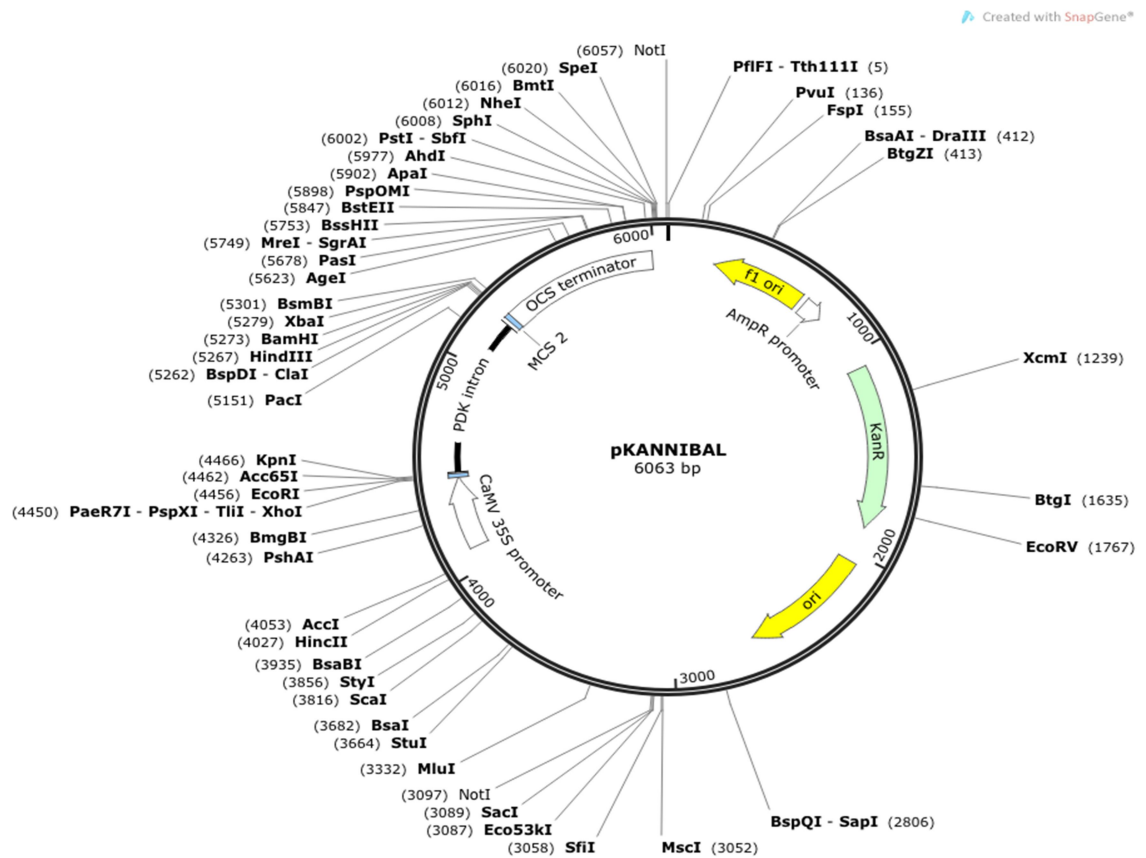


Figura 21. Mapa de restrição do plasmídeo de construção pKANNIBAL

pCAMBIA2301
11,634 bp

Restriction sites and positions (bp):

- (11,299) BspEI
- (10,872) HindIII
- (10,864) PstI - SbfI
- (10,854) SalI
- (10,848) XbaI
- (10,842) BamHI
- (10,839) SmaI
- (10,837) KpnI - TspMI - XmaI
- (10,833) Acc65I
- (10,831) SacI
- (10,829) Eco53AI
- (10,821) EcoRI
- (10,578) BstXI
- (10,578) lac operator
- (9115) RsrII
- (8913) PspXI
- (8395) SacII
- (8267) PstI
- (8122) Bpu10I
- (7791) BlnI
- (6454) BstZ17I
- (6252) MreI - SgrAI
- (5964) AgeI
- (5873) BsaI
- (5783) EcoNI
- (5354) BsiWI
- (4394) AclI
- (3800) PstI
- (2307) MauBI
- (2112) AflII
- (2061) BstEII
- (2048) DraIII - PmlI
- (216) AhdI
- (600) SnaBI
- (1309) BstBI

Other features:

- CaMV 35S promoter
- GUS
- NOS terminator
- 6xHis
- cat1 intron
- lacZa
- lac promoter
- MCS
- NeoR KanR
- CaMV poly(A) signal
- CaMV 35S promoter (enhanced)
- ori
- bom
- pVS1 RepA
- pVS1 STA
- RB T-DNA repeat

Figura 23. Mapa de restrição do plasmídeo Binário pCAMBIA 2301