

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

VÍVIAN CAIAFA FERREIRA PAIVA

**Desenvolvimento e otimização de sistemas de expressão de proteínas
recombinantes em capim-elefante e em tabaco**

Juiz de Fora - MG

2023

VÍVIAN CAIAFA FERREIRA PAIVA

**Desenvolvimento e otimização de sistemas de expressão de proteínas
recombinantes em capim-elefante e em tabaco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com concentração em Genética e Biotecnologia.

Orientador: Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos

Co-orientador: Doutor Jorge Fernando Pereira

Juiz de Fora – MG

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Paiva, Vívian Caiafa Ferreira.

Desenvolvimento e otimização de sistemas de expressão de proteínas recombinantes em capim-elefante e em tabaco / Vívian Caiafa Ferreira Paiva. -- 2023.
99 f.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Coorientador: Jorge Fernando Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Anticorpos monoclonais. 2. qPCR. 3. Regeneração. 4. Genotipagem. I. de Oliveira Santos, Marcelo, orient. II. Fernando Pereira, Jorge, coorient. III. Título.

Vívian Caiafa Ferreira Paiva

Desenvolvimento e otimização de sistemas de expressão de proteínas recombinantes em capim-elefante e em tabaco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética & Biotecnologia.

Aprovada em 24 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof.^a Dr.^a. Julliane Dutra Medeiros

Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Wagner Campos Otoni

Universidade Federal de Viçosa - UFV

Juiz de Fora, 05/04/2023.



Documento assinado eletronicamente por Marcelo de Oliveira Santos, Professor(a), em 25/04/2023, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Wagner Campos Otoni, Usuário Externo, em 25/04/2023, às 12:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Julliane Dutra Medeiros, Professor(a), em 02/05/2023, às 12:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1223969 e o código CRC 1A48F9DA.

*Ao meu eterno avô e pai, Melchisedech
Ferreira Maciel (in memoriam), que tanto fez
por mim enquanto em vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, por serem minha maior inspiração de vida e minha âncora. Obrigada por me ensinarem a importância de se viver com resiliência e me ajudarem a me descobrir sempre mais forte.

Ao meu orientador, Doutor Marcelo de Oliveira Santos, por todo imenso apoio e conhecimento passado e, principalmente, por compartilhar seus ideais comigo. Obrigada pela orientação, confiança, inspiração e grande amizade.

Ao Doutor Jorge Fernando Pereira, pela oportunidade de pesquisa e pela coorientação científica.

Aos meus amigos, futuros Mestres Moisés Gusmão e Stephane Rozini, Mestre Juliana Tatiara, Doutor Elyabe Matos, Mestre Silvioney Augusto, Rafael Valotti; e os meus mais novos presentinhos preciosos, Doutora Sara Malaguti, Gabriella Januzzi e Sebastião Marcelino que contribuíram com a pessoa e com a pesquisadora que sou e me apoiaram sempre nos momentos mais complicados dentro da ciência.

Aos incríveis pesquisadores Doutor Leonardo Quellis por todo ensinamento e suporte essencial; e Mestre Matheus Aragão, companheiro de projeto “à distância” extremamente dedicado.

Ao professores Doutor Carlos Maranduba, Doutor Lyderson Viccini, Doutor Eugênio Hottz, Doutora Jacy Gameiro, Doutora Julliane Dutra, Doutor Saulo Marçal e Doutor José Marcello, por toda ajuda e boa vontade sempre que necessária.

À banca examinadora, pelo aceite do convite.

Aos professores e pesquisadores que fizeram considerações para a melhoria deste trabalho.

Aos professores da Genética e Biotecnologia PPGCBio-UFJF, por todo conhecimento compartilhado que contribuiu para minha formação na pós-graduação.

Aos programas da EMBRAPA, FAPEMIG e CAPES, pela oportunidade de desenvolvimento de ambos os projetos, aqui divididos em capítulos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Ciências Biológicas, pela oportunidade de especialização e de obtenção do título.

“Há tantas auroras que não brilharam ainda”

- Nietzsche

RESUMO

PAIVA, VÍVIAN CAIAFA FERREIRA. Desenvolvimento e otimização de sistemas de expressão de proteínas recombinantes em capim-elefante e em tabaco. 2023. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2023.

Os avanços da biotecnologia atrelados ao melhoramento genético permitiram modificações genéticas mais precisas e controladas para a obtenção de características desejáveis nos organismos. Plantas transgênicas são uma opção atrativa na agricultura e na indústria farmacêutica, fornecendo resistência a doenças e a estresses ambientais, bem como permitindo a produção de proteínas recombinantes e de metabólitos secundários de interesse terapêutico. O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach syn. *Cenchrus purpureus* Schumach) é uma gramínea amplamente utilizada como forragem de elevado potencial de produção de matéria seca na pecuária leiteira e de corte. Todavia, insetos de alto potencial de danos às culturas, como as cigarrinhas das pastagens, podem impactar a produtividade da gramínea. O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes às pragas é uma alternativa viável para contornar essa problemática. No presente trabalho, objetivamos a obtenção de um protocolo de regeneração visando a transformação de capim-elefante cultivar BRS Capiáçu via *Agrobacterium tumefaciens*. Foi realizada a indução de gemas laterais em diferentes combinações de reguladores de crescimento 2,4D, BAP e TDZ, com a obtenção de 93% de regeneração de múltiplos brotos induzidos por 28 dias em tratamento contendo 0,1 mg.L⁻¹ 2.4-D e 2 mg. L⁻¹ BAP, com curva de seleção determinada de 50 mg. L⁻¹ de Canamicina e três dias como período de pré-cultivo. Os brotos regenerados apresentaram bom desenvolvimento radicular e de parte aérea e o tratamento com canamicina permitiu determinação da curva de seleção. No segundo capítulo deste documento, objetivamos caracterizar a expressão de transgene para a produção de um anticorpo recombinante de cadeia simples scFAB-anti-IL1 β a partir da obtenção de linhagens homozigotas estáveis de *Nicotiana benthamiana*. Este anticorpo foi sintetizado devido à importância biológica em doenças inflamatórias relacionadas com o aumento prolongado da citocina IL-1 β . Dessa forma, pretendemos a seleção de

linhagens de *N. benthamiana* para a produção estável do anticorpo scFAB-anti-IL1 β . Para isso, sementes de plantas transgênicas foram avaliadas quanto à presença do gene que expressa scFAB-anti-IL1 β em placas contendo meio MS com o agente de seleção canamicina. As plantas transgênicas apresentaram taxas de germinação entre 48,59% para o evento IL-1 β T0P22 e de 95,53% para o evento IL-1 β T0P20. As plântulas T1 advindas do evento IL-1 β T0P20 foram subcultivadas e (i) comparadas com plantas T0 hemizigotas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, com valores normalizados com gene endógeno *18S rRNA* e (ii) submetidas à extração e purificação de proteínas. A produção de scFAB-anti-IL1 β pelas regenerantes T1 apresentou rendimento aproximado de 474 μ g por grama de folha fresca. Com análise dos dados do qPCR e do RT-qPCR, verificou-se a presença de linhagens com valores estimados para duas cópias para o transgene na proporção esperada de 2:1. Todavia, os indivíduos tendenciaram ao silenciamento gênico, com redução na expressão do transgene.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais. qPCR. Regeneração. Genotipagem.

ABSTRACT

PAIVA, VÍVIAN CAIAFA FERREIRA. Development and optimization of recombinant protein expression systems in elephantgrass and tobacco. 2023. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética e Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2023.

Advancements in biotechnology combined with genetic improvement have allowed more precise and controlled genetic modifications to obtain desirable traits in organisms. Transgenic plants are an attractive option in agriculture and the pharmaceutical industry, providing resistance to diseases and environmental stresses, as well as enabling the production of recombinant proteins and therapeutically relevant secondary metabolites. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach syn. *Cenchrus purpureus* Schumach) is a widely used grass with high potential for dry matter production in dairy and beef cattle farming. However, insects with a high potential for crop damage, such as pasture spittlebugs, can impact the grass's productivity. The development of transgenic plants resistant to pests is a viable alternative to overcome this issue. In this study, we aimed to obtain a regeneration protocol for the transformation of elephant grass BRS Capiáçu for further application in genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Meristem induction was performed using different combinations of growth regulators 2,4-D, BAP, and TDZ, resulting in 93% regeneration of multiple shoots induced over 28 days with a treatment containing 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D and 2 mg.L⁻¹ BAP, with a selection curve determined at 50 mg.L⁻¹ kanamycin and a three-day pre-culture period. The regenerated shoots showed suitable root and shoot development, linked to a kanamycin-based determination of the selection curve. The second chapter of this document, our aim was to characterize the transgene expression for the production of a recombinant single-chain antibody scFAB-anti-IL1 β by obtaining stable homozygous lineages of *Nicotiana benthamiana*. This antibody was synthesized due to its biological importance in inflammatory diseases related to prolonged cytokine IL-1 β secretion. Thus, we intended to select *N. benthamiana* lineages for stable production of scFAB-anti-IL-1 β . Seeds were sown in plates containing MS medium with kanamycin and the presence of the scFAB-anti-IL-1 β was assessed, with lines showing transgene rates between 48.59% for IL-

1 β T0P122 and 95.55% for IL-1 β T0P20. T1 seedlings from IL-1 β T0P20 plants were subcultured and (i) compared with hemizygous T0 plants by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with values normalized with the 18S endogenous gene, and (ii) subjected to protein extraction and purification. The production of scFAB-anti-IL1 β by the T1 regenerants showed an approximate yield of 474 μ g per gram of fresh leaf mass. Analysis of qPCR and RT-qPCR data showed the presence of lines with estimated values for two copies of the transgene in the expected 2:1 ratio. However, homozygous individuals tended to exhibit genetic silencing, with reduced transgene expression.

Keywords: Monoclonal antibodies. qPCR. Regeneration. Genotyping.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	22
LISTA DE FIGURAS	23
LISTA DE TABELAS	26
1 DESCRIÇÃO DA DISSERTAÇÃO	22
2 REFERÊNCIAS	24
Capítulo I. DESENVOLVIMENTO E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS VISANDO À TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CAPIM-ELEFANTE (CULTIVAR BRS CAPIAÇU)	26
1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1 A cultivar BRS Capiaçú e seu uso na agropecuária brasileira.....	28
2.2 Danos das cigarrinhas das pastagens.....	30
2.3 A importância da cultura de tecidos vegetais na regeneração de transformantes.....	32
2.4 <i>Agrobacterium</i> na transformação genética de plantas.....	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 Obtenção, desinfestação e inoculação de explantes.....	37
4.2 Embriogênese Somática.....	37
4.3 Indução da Organogênese.....	38
4.4 Regeneração de brotos da BRS Capiaçú.....	38
4.5 Curva de seleção para transformantes de BRS Capiaçú.....	39
4.6 Citometria para análise de taxa proliferativa e definição do período de pré-cultura.....	39
4.7 Análises Estatísticas, confecção de gráficos e ilustrações.....	40
5 RESULTADOS	41
5.1 Indução de calogênese e embriogênese somática.....	41
5.2 Indução da organogênese de brotos múltiplos.....	44
5.3 Regeneração de brotos múltiplos.....	46
5.4 Curva de seleção.....	48
5.5 Dinâmica do Ciclo Celular e determinação do período de pré-cultura.....	49
6 DISCUSSÃO	50

7 CONCLUSÃO	53
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	54
9 REFERÊNCIAS.....	55
Capítulo II. <i>Nicotiana benthamiana</i> HOMOZIGOTAS TRANSGÊNICAS COMO PLATAFORMA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES scFAB PARA IL-1β.....	60
1 INTRODUÇÃO	60
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	62
2.1 A citocina IL-1 β e a relação com doenças inflamatórias	62
2.2 Plantas como biofábricas de proteínas heterólogas e o modelo de produção <i>Nicotiana benthamiana</i>	64
2.3 A importância da seleção e confirmação de homocigotos como linhagens transgênicas segregadoras e estáveis.....	66
3 OBJETIVOS.....	68
3.1 Objetivo Geral	68
3.2 Objetivos Específicos.....	68
4 METODOLOGIA	69
4.1 Cultivo e manutenção de <i>Nicotiana benthamiana</i>	69
4.2 Estabilidade genética por citometria de fluxo	69
4.3 Detecção de gene repórter GFP	70
4.4 Aclimatização de plantas T0 para produção de sementes.....	70
4.5 Extração de DNA	71
4.6 Análise genotípica por qPCR e Identificação de linhagens transgênicas T1 ...	72
4.7 Extração de RNA	73
4.8 Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa	73
4.9 Análise da expressão do transgene por RT-qPCR de cDNA	74
4.10 Extração e purificação de proteínas.....	74
4.11 <i>Dot blotting</i>	74
4.12 Eletroforese em gel de acrilamida SDS-page	75
4.13 Análises Estatísticas	76
5 RESULTADOS.....	77
5.1 Conteúdo de DNA e visualização da presença de GFP em eventos T0	77
5.2 Obtenção de plantas T1 a partir da aclimatização de plantas T0.....	79
5.3 Genotipagem de linhagens T1	82
5.4 Extração e purificação de proteínas, eletroforese SDS-page e <i>dot-blotting</i>	85

5.5 Extração de RNA e análise de expressão de scFAB-anti-IL1 β em plantas T1 de <i>N. benthamiana</i>	87
6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÃO	91
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	92
9 REFERÊNCIAS	93
ANEXO A – Número de amostras por tratamento de indução de embriogênese somática (ES) e organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiacu	98
ANEXO B – PIPELINE para produção de anticorpos recombinantes	99

LISTA DE SIGLAS

cv. BRS Capiaçú = cultivar BRS Capiaçú

ES = embriogênese somática

BAP = 6-Benzilaminopurina

TDZ = thidiazuron

2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético

CuSO₄ = sulfato de cobre

AgNO₃ = nitrato de prata

Plasmídeo Ti = Plasmídeo *Tumor inducing*

EtOH = etanol

NaClO = hipoclorito de sódio

MS = Murashige-Skoog

RCs = reguladores de crescimento

D0B0T0 = tratamento controle sem reguladores de crescimento

D2B0.5 = tratamento com 2 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0.5 mg.L⁻¹ BAP

D2B0.1 = tratamento com 2 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0.1 mg.L⁻¹ BAP

D4B0.1 = tratamento com 4 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0.1 mg.L⁻¹ BAP

D0.5B2T0 = tratamento com 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ

D0.1B2T0 = tratamento com 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ

D0.5B0T2 = tratamento com 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ

D0.1B0T2 = tratamento com 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ

PPM = *Plant Preservative Mixture*

NaEDTAFE.3H₂O = Sulfato de ferro tri-hidratado

mAbs = anticorpos monoclonais

scFAB = fragmentos de cadeia única da região de ligação ao antígeno

scFv = fragmentos de cadeia única das regiões variáveis de anticorpo

IL-1 = interleucina-1

PAMPs = Padrões moleculares associados a patógenos

Ct = *Cycle Threshold*

Ctab = brometo de cetrimônio

cDNA = DNA complementar

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** BRS Capiaçú: uma cultivar de capim-elefante de alta produtividade e rendimento (Foto por Antonio Vander Pereira; PEREIRA, 2021 adaptado).29
- Figura 2.** Ilustração das etapas resumidas da obtenção de uma planta transgênica com transformação mediada por *Agrobacterium*. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é geneticamente modificada para carregar um plasmídeo com um gene de interesse que será inserido no genoma da planta hospedeira por meio da infecção da planta com a bactéria durante o período da co-cultura. O processo de seleção e regeneração é facilitado pela presença de antibióticos, para interromper a infecção; e de auxinas e citocininas, que promovem o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais infectados e transformados. Fonte: Elaborado pelo autor.....35
- Figura 3.** Ilustração da excisão e das gemas axilares e inoculação em meio de cultivo (A). Calos friáveis formados após 14 dias de indução em D2B0.5 (C) e em D2B0.1 (D). Calos compactos foram observados aos 28 dias em D2B0.5 (F) e em D2B0.1 (G). Em (B) e (E) respostas do grupo controle aos 14 e 28 dias, respectivamente. Em (H), dados gráficos do % de indução, em que 0=0% e 1=100%; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.....42
- Figura 4.** Formação de calos compactos característicos de embriogênese somática (A) e dados gráficos representando o percentual de indução da calogênese (B) e da embriogênese somática (C) após 20 dias de indução em tratamento D4B0.1. Dados gráficos indicam 0=0% e 1=100% de indução; os tratamentos com (*) diferem significativamente com $p < 0,05$ no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.43
- Figura 5.** As letras (A), (B), (C), (D), e (E) representam as respostas dos explantes inoculados nos meios D0B0T0, D0.5B2T0, D0.1B2T0, D0.5B0T2 e D0.1B0T2 após 14 dias, enquanto que as letras (F), (G), (H), (I), e (J) mostram as respostas dos explantes inoculados nos meios D0B0T0, D0.5B2T0, D0.1B2T0, D0.5B0T2 e D0.1B0T2 após 28 dias, respectivamente. Em (K), dados gráficos do desenvolvimento de brotos ao longo de 14 e 28 dias e indicam 0=0% e 1=100% de indução; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.45

Figura 6. Variações morfológicas observadas após a regeneração de gemas axilares de BRS Capiáçu expostas a diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thiodiozuron (TDZ) hormônios. Em (A) meio livre de hormônio (D0B0T0), em (B) 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ (D0.5B2T0), em (C) 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg. L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ (D0.1B2T0), em (D) 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ (D0.5B0T2) e em (E) 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ (D0.1B0T2). Em (F), (G), e (H) as variáveis ‘número de perfilhos’, ‘comprimento da raiz’ e ‘comprimento da parte aérea’ foram, respectivamente, analisadas. os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com p<0,05 no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

.....47

Figura 7. Respostas das gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiáçu) expostas por 14 dias em meio de regeneração de brotos D0.1B2T0 contendo diferentes concentrações de canamicina. Dados representados em % de sobrevivência em que o eixo y indica 0=0% e 1=100%; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com p<0,05 no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.48

Figura 8. Dinâmica do ciclo celular observado em gemas axilares pré-tratadas com 0,1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ (D0.1B2T0), com o percentual de células nos ciclos celulares G1, S e G2 analisado, via citometria de fluxo nos tempos de 0 (PC0) 2 (PC2), 3 (PC3), 4 (PC4) e 5 (PC5) e 6 (PC6) dias de pré-tratamento. Os tratamentos com (*) diferem significativamente com p<0,05 no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.49

Figura 9. Esquema representativo da herança mendeliana em plantas transgênicas. Na geração parental T0, as plantas transgênicas são hemizigóticas para o gene de interesse. A segregação do transgene em T0 resulta em descendentes hemizigotos, homozigotos (apresentam duas cópias dos transgene) e wild type em T1. Apenas um quarto da geração é homozigota e permite a estabilidade da expressão do transgene. Fonte: Elaborado pelo autor.67

Figura 10. Mapa esquemático do vetor pK7WG2D com o cassete de expressão do anticorpo recombinante scFAB-anti-IL1β (ARAGÃO, 2022 adaptado).70

Figura 11. Ilustração da metodologia de citometria de fluxo (A). Em (B) os histogramas obtidos na citometria e em (C) os dados de citometria em análise gráfica comparando o conteúdo genômico dos eventos transgênicos com o controle wild type; os

percentuais indicados nas barras representam os eventos lidos. Observou-se em (D) a semelhança entre o vigor fenotípico *in vitro* entre plantas dos eventos transgênicos e de plantas wild type. Foi possível validar a ausência (E) de GFP em plantas wild type, bem como a presença de GFP em (F), (G), (H), (I) e (J) nos eventos IL-1 β T0P10, IL-1 β T0P13, IL-1 β T0P17, IL-1 β T0P20 e IL-1 β T0P21, respectivamente. EXPLICAR OS PERCENTUAIS DOS GRAFICOS78

Figura 12. Esquema ilustrativo do processo de aclimatização, da coleta de sementes de indivíduos transgênicos T0 de *N. benthamiana* e da seleção de segregantes (A). Em (B), foto ilustrativa da segregação 3:1 de Indivíduos T1 oriundos da germinação de sementes T0 de *N. benthamiana* do evento transgênico IL-1 β T0P20. Em (C) os indivíduos de T1 do evento IL-1 β T0P20 transplantados para tubos *in vitro* 6 dias após a germinação.....81

Figura 13. Eficiência de amplificação dos genes scFAB IL-1 β (A) e 18S (B). O coeficiente de correlação linear (R^2) e o coeficiente de inclinação da reta estão apresentados no gráfico.....82

Figura 14. Em (A) a curva padrão de amplificação com uso dos primers 18s e scFAB IL-1 β e em (B) a curva de dissociação. Dados de Ct gerados por qPCR usados para cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ permitiram a identificação de indivíduos de *N. benthamiana* com um ou dois números de cópia para o transgene scFAB-anti-IL1 β (C).....83

Figura 15. Ilustração esquemática do processo de extração proteína de *N. benthamiana*. Em (B) a eletroforese do extrato bruto das folhas de plantas T1 com Coloração por Coomassie Brilliant Blue. Em (C) e em (D), a representação do SDS-page 15% das frações GF1, GF2 e GF3, com coloração por Coomassie Brilliant Blue e por prata, respectivamente. Em (E) a confirmação da produção do anticorpo recombinante por dot blotting (E). Em que, M: marcador de massa molecular; GPtnT: Proteína total de plantas germinadas; A250= BSA 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A125= BSA 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A25= BSA 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A1= BSA 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; GF1-F3: Germinadas frações 1-3; CN: Extrato bruto proteico de plantas wild type.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos com reguladores de crescimento utilizados para indução de embriogênese somática em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiáçu	38
Tabela 2. Tratamentos com reguladores de crescimento utilizados para indução de organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiáçu ...	39
Tabela 3. Proliferação de calos e indução de embriogênese somática em explantes de capim-elefante 'BRS Capiáçu' inoculados em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) nos tempos de 14 e 28 dias. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.	41
Tabela 4. Indução de organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiáçu) inoculados em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ), com análises realizadas aos 14 e 28 dias. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.	44
Tabela 5. Análises morfológicas realizadas após o cultivo por 14 dias de brotos múltiplos recuperados a partir da exposição de gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiáçu) em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ). Dados apresentados em média \pm desvio padrão.	46
Tabela 6. Sequências de primers utilizados para as sequências alvo scFAB-anti-IL1 β e 18s.	72
Tabela 7. Avaliação das respostas de germinação de sementes advindas de plantas T0 de <i>N. benthamiana</i> transgênicas para a produção de scFAB-anti-IL1 β	80
Tabela 8. Padrão de segregação do transgene na progênie de plantas T0 de <i>N. benthamiana</i> transgênicas para scFAB-anti-IL1 β	80
Tabela 9. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos em qPCR para a relação a linhagem hemizigota T0 e a identificação de indivíduos heterozigotos e de linhagens homozigotas de <i>N. benthamiana</i> transgênica para scFAB-anti-IL1 β	84
Tabela 10. Valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ obtidos em RT-qPCR da expressão do transgene scFAB-anti-IL1 β de segregantes T1 em relação a planta mãe hemizigota T0.	87

1 DESCRIÇÃO DA DISSERTAÇÃO

O melhoramento é uma técnica utilizada por milhares de anos para obtenção de plantas com características desejáveis, como maior produtividade, resistência a doenças, tolerância a estresses ambientais e melhor qualidade nutricional (AHMAR *et al.*, 2020). Com o avanço de técnicas biotecnológicas, essas necessidades foram supridas e aumentaram a disponibilidade de características por meio da realização de modificações genéticas mais precisas e controladas, permitindo produções mais rápidas de culturas geneticamente melhoradas (AHMAR *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2022).

As ferramentas de engenharia genética alteram diretamente o material genético de um determinado organismo por meio da introdução de genes interespecíficos ou de remoção/variações da sequência de ácidos nucleicos de genes intraespecíficos (SHARMA *et al.*, 2022; DONG; RONALD, 2019). Essas modificações são realizadas objetivando a obtenção de culturas modificadas com caracteres desejáveis de resistência ou, inclusive, de produção de proteínas terapêuticas (DONG; RONALD, 2019; COLLINGE; SARROCCO, 2022; SUN *et al.*, 2023).

Plantas transgênicas com modificações genéticas introduzidas com a tecnologia de DNA recombinante por infecção por *Agrobacterium* (*syn. Rhizobium*) tornaram-se uma alternativa atraente de produção (CHRISTEY, 2020). As vantagens de produção incluem, (i) na esfera agrícola, resistência a doenças, pragas e estressores abióticos, além de um maior rendimento de produção; enquanto que, (ii) na esfera farmacêutica, as culturas transgênicas funcionam como plataformas de produção de proteínas recombinantes de uso terapêutico e de metabólitos secundários (GUNARATHNE *et al.*, 2019; KOWALCZYK *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2019).

Embora a tecnologia de transformação genética de plantas tenha avançado significativamente nas últimas décadas, muitas espécies vegetais ainda apresentam características recalcitrantes ou carecem de metodologias eficientes de transformação e de regeneração de células transformadas (GORDON-KAMM *et al.*, 2019; ALTPETER *et al.*, 2016). Essas características limitam o progresso no melhoramento genético de culturas, necessitando, assim, de protocolos eficientes tanto para transformação quanto para a seleção de plantas transformadas (GORDON-KAMM *et al.*, 2019; ALTPETER *et al.*, 2016).

A regeneração de brotos *in vitro* para a propagação rápida e eficiente de plantas a partir de pequenos fragmentos de tecido é um passo essencial para obtenção de culturas detentoras de características desejáveis (GALÁN-ÁVILA *et al.*, 2020; UMAMI *et al.*, 2022). Assim, o primeiro capítulo dessa dissertação conta com o estabelecimento de um protocolo de regeneração para transformação de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach. syn. *Cenchrus purpureus* Schumach cultivar (cv.) BRS Capiapu) mediada por *A. tumefaciens*.

O protocolo de regeneração *in vitro* foi desenvolvido considerando a importância econômica, a grande capacidade de produção e o acúmulo de matéria seca de boa qualidade nutricional do capim-elefante, que é uma das espécies forrageiras mais utilizadas em sistemas de corte e transporte de forragem e silagem (PEREIRA *et al.*, 2021). Nesse contexto, a cv. BRS Capiapu é amplamente utilizada para alimentação suplementar de gado a pretexto do alto potencial de produção total de matéria seca (~50 t/ha/ano) (PEREIRA *et al.*, 2021).

Ademais, além dos desafios observados na recuperação de um indivíduo viável a partir de células transformadas por meio de técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*, a baixa frequência de eventos transformados de forma estável também é um obstáculo na produção eficiente de plantas transgênicas, visto que a expressão variável do transgene é fator comprometedor em etapas *downstream* (ALTPETER *et al.*, 2016; KAMMAR *et al.*, 2023).

Destarte, faz-se imprescindível a autopolinização dos eventos transgênicos recuperados após a transformação genética para a seleção de indivíduos homozigotos como linhagens para manutenção do fenótipo transgênico ao longo das gerações (ZHANG *et al.*, 2021; KAMMAR *et al.*, 2023). Em vista disso, o segundo capítulo visou a obtenção e a seleção de indivíduos homozigotos como linhagens transgênicas estáveis de *Nicotiana benthamiana* recombinantes para a produção de um anticorpo de cadeia simples scFAB-anti-IL-1 β .

2 REFERÊNCIAS

AHMAR, S. *et al.* Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2590, 2020.

ALTPETER, F. *et al.* Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

CHRISTEY, M. C. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. In: **Hairy Roots**. CRC Press, 2020. p. 100-112.

COLLINGE, D. B.; SARROCCO, S. Transgenic approaches for plant disease control: Status and prospects 2021. **Plant Pathology**, v. 71, n. 1, p. 207-225, 2022.

DONG, O. X.; RONALD, P. C. Genetic engineering for disease resistance in plants: recent progress and future perspectives. **Plant physiology**, v. 180, n. 1, p. 26-38, 2019.

GALÁN-ÁVILA, A. *et al.* Development of a direct in vitro plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. seedling explants: developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 645, 2020.

GORDON-KAMM, B. *et al.* Using morphogenic genes to improve recovery and regeneration of transgenic plants. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 38, 2019.

GUNARATHNE, V. *et al.* Transgenic plants: Benefits, applications, and potential risks in phytoremediation. In: **Transgenic plant technology for remediation of toxic metals and metalloids**. Academic Press, p. 89-102, 2019.

GUO, M. *et al.* *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 1, p. 259-270, 2019.

KAMMAR, S. S. *et al.* Assessment of homozygosity in transgenic plants using selectable markers. **STAR Protocols**, v. 4, n. 1, p. 102031, 2023.

KOWALCZYK, T. *et al.* Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 795, 2022.

PEREIRA, A. V. *et al.* Elephantgrass, a tropical grass for cutting and grazing. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2021.

SHARMA, P. *et al.* Genetic modifications associated with sustainability aspects for sustainable developments. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 9509-9521, 2022.

SUN, H. *et al.* Antibody-Dependent Enhancement Activity of a Plant-Made Vaccine against West Nile Virus. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 197, 2023.

UMAMI, N. *et al.* The effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, benzyl amino purin and cupric sulphate on in vitro propagation system from shoot apices of shoot tiller of hybrid Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum). In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012088.

ZHANG, Q. *et al.* Development of homozygous transgenic *Atropa belladonna* plants with glyphosate resistance and high-yield scopolamine using metabolic engineering. **Industrial Crops and Products**, v. 171, p. 113953, 2021.

Capítulo I. DESENVOLVIMENTO E ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE CULTURA DE TECIDOS VISANDO À TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CAPIM-ELEFANTE (CULTIVAR BRS CAPIAÇU)

1 INTRODUÇÃO

O capim-elefante (*P. purpureum* Schumach syn. *C. purpureus* Schumach) é uma gramínea C4 utilizada como forragem de elevado potencial de produção de matéria seca, sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais para o fornecimento da base alimentar dos ruminantes para produção de leite e carne (ROSA *et al.*, 2019; PEREIRA; LÉDO; MACHADO, 2017). Com o programa de desenvolvimento de cultivares para sistema de corte e de pastoreio da Embrapa Gado de Leite, a cv. BRS Capiaçú, recentemente lançada, inova na qualidade, na produção de silagem e matéria seca e no teor nutricional (PEREIRA; LÉDO; MACHADO, 2017).

Devido à alta adaptabilidade às diferentes condições climáticas e à produtividade de 49,8 t/ha/ano de matéria seca, a cultivar é utilizada em forragens tropicais para alimentação animal. Algumas opções de uso incluem o pastoreio e o sistema de corte ou de silagem. Sendo utilizada por aproximadamente 25% dos produtores brasileiros de carne e de leite, reforça-se a importância e a necessidade de estudos para o aprimoramento da resistência da cultivar a pragas e a doenças (AMARAL *et al.*, 2020).

Apesar da alta rentabilidade e resistência a pragas, a qualidade e o rendimento da cv. BRS Capiaçú ainda são fatores que podem ser afetados por insetos de potencial danos às culturas (SARAIVA *et al.*, 2021). As cigarrinhas prejudicam o bom desenvolvimento da planta ao interferir em vias de reguladores de crescimento (RCs) em capim-elefante, como as vias do ácido jasmônico e da zeatina (SARAIVA *et al.*, 2021). Interferências como essas podem resultar no decaimento da produtividade em até 50% em infestações mais graves (SCHÖBEL; CARVALHO, 202).

A alta diversidade de insetos que se alimentam das forragens – principalmente em períodos climáticos que favorecem o desenvolvimento de diferentes espécies – faz com que o controle de pragas em grandes áreas seja, além de economicamente desfavorável, de difícil execução por falta de cultivares resistentes (PEREIRA *et al.*, 2021). Com isso, fazem-se necessárias soluções eficientes, sustentáveis e

econômicas para mitigar essas interferências a fim de minimizar os prejuízos causados na produtividade vegetal (ALVARENGA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2021).

Alternativas viáveis ao uso desenfreado de pesticidas contam com o estabelecimento de organismos transgênicos que expressem efeitos protetivos aos insetos predadores, objetivando a qualidade e produtividade da cv. BRS Capiaçú (IQBAL *et al.*, 2021; KAMATHAM *et al.*, 2021; ZAFAR *et al.*, 2022). As técnicas de aquisição de resistência de plantas contra pragas contam com o entendimento de interações inseto-planta e com o uso da engenharia genética para a inserção de DNA exógeno, que pode ser mediada por *Agrobacterium* ou por bombardeio de partículas (TALAKAYALA; KATTA. 2020; TYAGI *et al.*, 2020).

Entretanto, o uso de ferramentas de engenharia genética para edição de genomas necessita de sistemas eficientes e reprodutíveis de transformação e regeneração de plantas, com o estabelecimento de explantes como alvos de transferência do DNA exógeno de interesse para que, em seguida, em um meio de cultivo específico, seja possível o crescimento de células transformadas e a formação de uma planta transgênica (REIS *et al.*, 2019; SARKAR; JHA, 2021).

Para isso, na indução *in vitro* de brotos e de embriões, são utilizadas diferentes combinações de RCs, como citocininas e auxinas, uma vez que os explantes raramente possuem altas concentrações hormonais endógenas para iniciar um processo completo de regeneração. Assim, os RCs desempenham um papel importante na regeneração de transformantes, em que a relação entre esses reguladores é crítica para a eficiência da transformação (PETTI, 2020).

Para a cv. BRS Capiaçú, o desenvolvimento de um protocolo eficiente de regeneração para a transformação e incorporação de genes para resistência a pragas e doenças é de grande demanda. As recuperações de plantas transformadas podem ser feitas pela regeneração de brotos múltiplos ou pela indução de embriões somáticos a partir de células meristemáticas (ASADI-AGHBOLAGHI *et al.*, 2021; UMAMI *et al.*, 2022).

Considerando a importância agrícola da cultivar como forrageira, objetivou-se a obtenção de um protocolo de regeneração eficiente para transformação da cv. BRS Capiaçú de capim-elefante para sistemas de transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, pela indução da embriogênese somática (ES) e/ou pela indução de organogênese de brotos múltiplos com o uso de reguladores de crescimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultivar BRS Capiaçú e seu uso na agropecuária brasileira

O cultivo de forrageiras produtivas e de alta qualidade nutricional é uma prática comumente buscada por pecuaristas, uma vez que é um fator que contribui diretamente com a produtividade animal, com a qualidade dos produtos gerados e com a rentabilidade do negócio. O gênero *Pennisetum*, do qual faz parte o capim-elefante, é uma das opções de gramíneas C4 tropicais utilizadas para corte diário ou produção de silagem (LEAL *et al.*, 2020).

Sendo amplamente reconhecido como uma das gramíneas tropicais mais produtivas, em termos de biomassa forrageira, o capim-elefante apresenta valores nutritivos adequados para a alimentação de bovinos de corte e de leite, sendo frequentemente utilizado na produção de silagem ou de picados frescos no cocho (ROSA *et al.*, 2019; RETORE *et al.*, 2021).

Desde 1991, a Embrapa Gado de Leite investe em projetos de melhoramento genético de capim-elefante para o desenvolvimento de novas cultivares com características específicas de corte e de pastoreio. Dentro desse cenário, as cultivares BRS Capiaçú e BRS Kurumi foram desenvolvidas com o objetivo de produzir um capim de melhor qualidade para alimentação do gado visando ao aprimoramento da produção agropecuária (PEREIRA, 2021)

A cv. BRS Capiaçú vem ganhando popularidade e sendo amplamente utilizada para forragens de alta produtividade, visto que, além do alto valor nutricional e rendimento em massa seca, possui adaptações a diferentes tipos de solo, principalmente quando considerando-se a pressão exercida por regiões semiáridas que possuem recursos hídricos mais limitados (ROSA *et al.*, 2019; MONÇÃO *et al.*, 2020).

Algumas das características mais marcantes da cultivar englobam o porte elevado, com possibilidades de alcançar mais de quatro metros de altura, as folhas largas e longas de coloração verde e os colmos robustos e grossos com entrenós longos que os tornam aptos para serem utilizados na propagação vegetativa por meio de estacas (PEREIRA *et al.*, 2021).

Ademais, quando comparada a outras cultivares de capim-elefante, a cv. BRS Capiaçú possui um maior teor de carboidratos solúveis e proteínas brutas, tornando-a ideal para a produção de silagem (PEREIRA, 2021). Outras características

envolvem a alta resistência a quedas ou tombamentos - causados por ventos fortes ou outras condições ambientais adversas, por exemplo - e a boa adaptação para colheita mecânica, aumentando a eficiência e reduzindo custos na colheita (PEREIRA; LÉDO; MACHADO, 2017).

O preparo do solo para o cultivo do capim-elefante, inicialmente demanda de manejos convencionais realizados conforme as necessidades e condições do solo do terreno a ser plantando, com solos profundos, de fertilidade adequada e de boa drenagem em terrenos de fácil mecanização, irrigação e transporte da forragem colhida (ROSA *et al.*, 2019).



Figura 1. BRS Capiçu: uma cultivar de capim-elefante de alta produtividade e rendimento (Foto por Antonio Vander Pereira; PEREIRA, 2021 adaptado).

2.2 Danos das cigarrinhas das pastagens

A formação e a gestão de pastagens por gramíneas forrageiras são fatores extremamente significativos para a produção de carne e leite no Brasil, uma vez que a exploração de pastagens adequadas e de alta qualidade é o principal método utilizado para alimentação do gado bovino. Assim, é necessário entender os fatores que limitam seu crescimento e produtividade, bem como o manejo adequado de nutrientes e de pragas de forma a garantir pastagens saudáveis e mais acessíveis (ALVARENGA *et al.*, 2019).

A alta diversidade de espécies que se alimentam da seiva das forragens faz com que o controle de pragas em grandes áreas seja, além de economicamente desfavorável, de difícil execução por falta de cultivares resistentes – principalmente em períodos climáticos que favorecem o desenvolvimento destes insetos –, demandando de soluções sustentáveis e econômicas a fim de minimizar os prejuízos causados (ALVARENGA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2021).

Dentre as várias espécies de insetos que causam danos significativos à cultura de capim-elefante, é possível destacar *Notozulia entreriana* (Berg), *Deois schach* (Fabricius), *Mahanarva fimbriolata* (Hom.), e *M. liturata* (LePeltier & Serville), sendo as espécies do gênero *Mahanarva* as principais cigarrinhas consideradas pragas responsáveis por danos na produtividade e qualidade da forragem, podendo reduzir em até 54% a produção de forragem em uma infestação de 50 adultos por metro quadrado (PEREIRA *et al.*, 2021).

As cigarrinhas são insetos hemípteros (Cercopidae) e apresentam uma ampla distribuição geográfica, afetando, principalmente, pastagens tropicais, com danos concentrados na estação chuvosa, em que as ninfas eclodem de ovos quiescentes e alimentam-se da planta. Quando indivíduos adultos, injetam excreções salivares tóxicas que causam a fitotoxemia, distúrbio fisiológico das plantas que pode levar à clorose, necrose e morte de perfilhos e que, conseqüentemente, afetam o desenvolvimento das forrageiras (CONGIO *et al.*, 2020).

Alternativas viáveis ao uso prolongado e desenfreado de pesticidas contam com o uso de ferramentas biotecnológicas para o estabelecimento de organismos transgênicos que expressem efeitos protetivos aos insetos predadores, mitigando o ataque das pragas com plantas que resistem às toxinas injetadas responsáveis por

afetar a qualidade da cultivar (IQBAL *et al.*, 2021; KAMATHAM *et al.*, 2021; ZAFAR *et al.*, 2022).

A engenharia genética tem se mostrado eficaz no melhoramento de cultivares utilizadas em produções agrícolas, sendo uma ferramenta valiosa para resistência das plantas a insetos a partir da introdução de genes que irão conferir essa resistência, como genes *Bt*, utilizados em diferentes plantas como estratégia econômica (DESSOKY *et al.*, 2021; SMITH, 2021).

2.3 A importância da cultura de tecidos vegetais na regeneração de transformantes

O crescimento e a organogênese contínua são características das plantas ocasionadas pela ação dos meristemas, que são um agrupamento de células indiferenciadas, em estado pluripotente e ativo dependente de um ambiente celular específico para diferenciação (NICOLAS; LAUFS, 2022). Devido à alta capacidade de regeneração e de proliferação celular, são frequentemente utilizados como explantes para a transformação genética de plantas (NICOLAS; LAUFS, 2022; SOOD; SINGH, 2019; IBRAHIM; DRAAJ, 2020).

Na indução *in vitro* de brotos e de embriões são utilizadas diferentes combinações de RCs, uma vez que os explantes raramente possuem altas concentrações hormonais endógenas para iniciar um processo completo de regeneração; assim, desempenham um papel importante na regeneração de transformantes e a relação usada entre esses reguladores é crítica para a eficiência da transformação (LESTARI *et al.*, 2019; PETTI, 2020;).

Na cultura de tecidos vegetais, as citocininas são reguladores que estimulam a divisão celular e induzem o surgimento de gemas laterais e de brotos que formarão um indivíduo por completo (MONTESINOS *et al.*, 2020). As citocininas mais utilizadas *in vitro* são a 6-Benzilaminopurina (BAP), a meta-topolina (MT, 6-(3-hydroxybenzylamino) purina), a Cinetina (CIN), a 2-Isopenteniladenina (2iP) e o Thidiazuron (TDZ), uma fenilureia sintética que inicialmente foi classificada como uma auxina, mas que conforme a concentração pode exercer efeito de citocinina (LÓN; REINIGER; SILVA, 2020; ZAYTSEVA; AMBROS; NOVIKOVA, 2021; LI *et al.*, 2021).

As auxinas, outro grupo de hormônios vegetais também utilizado na regeneração de explantes, desempenham um papel fundamental na regulação de eventos importantes no crescimento celular e na formação de embriões somáticos, sendo as mais utilizadas o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido indol-3-butírico (AIB), bem como o ácido 2-naftoxiacético (2-NOA), o ácido naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), este último altamente eficiente na formação de embriões somáticos *in vitro* (ASGHAR *et al.*, 2022).

Além dos RCs presentes no meio de indução *in vitro*, a suplementação com micronutrientes também é indispensável para composição de macromoléculas enzimáticas e para a diferenciação de tecido (ISAH; UMAR, 2022). Isah e Umar

(2022), a partir do uso de suplementação com sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e nitrato de prata (AgNO_3), em *Gladiolus hybridus* obtiveram, dependente da concentração, a indução de calos e diferenciação de tecido embriogênico com ES e a morfogênese de brotos.

A aquisição de pluripotência para regeneração de brotos envolve etapas distintas e fundamentais para a regeneração de plantas, em que os RCs atuam diretamente na ES e/ou na organogênese de brotos e induzem as células para um caminho de competência e de determinação para formação de tecidos específicos (CHAMBHAARE; NIKAM, 2022; SHIN; BAE; SEO, 2020; GONDO *et al.*, 2017).

Em células já diferenciadas e terminais, a progressão do ciclo celular é suprimida e, com a aplicação externa de RCs, como auxinas e citocininas, é possível induzir a formação de calos em diversas espécies de plantas. A indução de calose e formação de calos indica a acumulação de células em crescimento massivo induzidas por RCs e injúrias mecânicas/físicas (IKEUCHI; SUGIMOTO; IWASE, 2013).

O processo de calogênese e, conseqüentemente a formação de calos, é uma etapa inicial na regeneração de plantas pela ES (RAMOS *et al.*, 2017). Um dos indicadores do crescimento do calo é a textura friável ou compacta, em que os calos friáveis são quebradiços devido ao grande espaço intercelular e as ligações intercelulares frouxas; já os calos compactos apresentam-se com ligações intercelulares mais firmes tornando-os de difícil separação (MUTHI'AH *et al.*, 2023).

Ambos os termos “ES” e “organogênese de brotos” envolvem vias de regeneração diretas e indiretas (HNATUSZKO-KONKA *et al.*, 2021). Durante a organogênese, as células adquirem a competência para originar meristemas específicos, como os dos sistemas apical ou radicular, enquanto que na ES, existe o desenvolvimento simultâneo de ambos os polos meristemáticos e permite a formação de embriões completos (CAPRIOTTI *et al.*, 2023).

2.4 *Agrobacterium* na transformação genética de plantas

A *Agrobacterium* é uma bactéria do solo que tem a capacidade de transferir material genético para células vegetais, sendo uma ferramenta importante e altamente reprodutível e de fácil manuseio para a transformação genética de plantas (THOMPSON *et al.*, 2020). Essa transferência permite uma ou poucas inserções de fragmentos exógenos de DNA em detrimento da biobalística, que frequentemente leva a inserções múltiplas indesejáveis e apresenta limitações no que tange ao tamanho do inserto (MELO *et al.*, 2020; OZYIGIT; KURTOGLU, 2020; THOMPSON *et al.*, 2020).

Por outro lado, além do risco de inserções múltiplas do segmento de DNA no hospedeiro, a biobalística também possui um custo relativamente elevado quando levando-se em consideração os equipamentos necessários e os produtos utilizados nos protocolos. Entretanto, é um método amplamente utilizado, cabendo ao pesquisador a liberdade de escolha de acordo com o gene a ser introduzido, o explante a ser utilizado e os resultados almejados durante o processo de regeneração (KUMAR; LING, 2021).

A transformação genética mediada *A. tumefaciens* é um processo amplamente utilizado na biotecnologia vegetal, que requer a ativação da expressão de genes de virulência (*vir*) do plasmídeo Ti (*Tumor-inducing*) por sinais químicos (composto fenólico acetoseringona) (GELVIN, 2017; CARNEIRO *et al.*, 2019). Com a utilização dos produtos gênicos *vir* para processar e transferir proteínas e uma fita simples de DNA (a fita T), os genes de transferência de DNA (T-DNA) podem ser clonados e integrados ao genoma do hospedeiro (GELVIN, 2017; BINNS; ZHAO, 2020).

Uma das espécies mais utilizadas para a transformação via *Agrobacterium* é a *A. tumefaciens*, principalmente as cepas LBA4404, EHA101 e GV3101. A bactéria atua como vetor de entrada do DNA de interesse na planta a ser transformada durante um período denominado de co-cultura e, após esse intervalo, é eliminada com auxílio de antibióticos em processos *downstream* sem danos prejudiciais à planta (DUTRDHAR; MANDAL, 2023) (FIGURA 2).

Destarte, com o uso dessas metodologias de transformação genética, a partir da transferência de sequências gênicas que conferem resistência a plantas, é possível obter um manejo integrado de pragas que contribua com sustentabilidades ecológicas – visto ter uma menor demanda no uso de agroquímicos que podem ser prejudiciais

ao meio ambiente e à saúde humana – atreladas aos benefícios econômicos de produção da agroindústria (TALAKAYALA; KATTA. 2020; TYAGI *et al.*, 2020).

Plantas C4 monocotiledôneas não são hospedeiros naturais para *Agrobacterium*. Assim como para outras gramíneas C4, a busca de sistemas eficientes de regeneração e de transformação genética é desafiadora e amplamente realizada (NGUYEN *et al.*, 2020). Para a cv. BRS Capiçu, não foram desenvolvidos protocolos eficientes para a regeneração de plantas transgênicas.

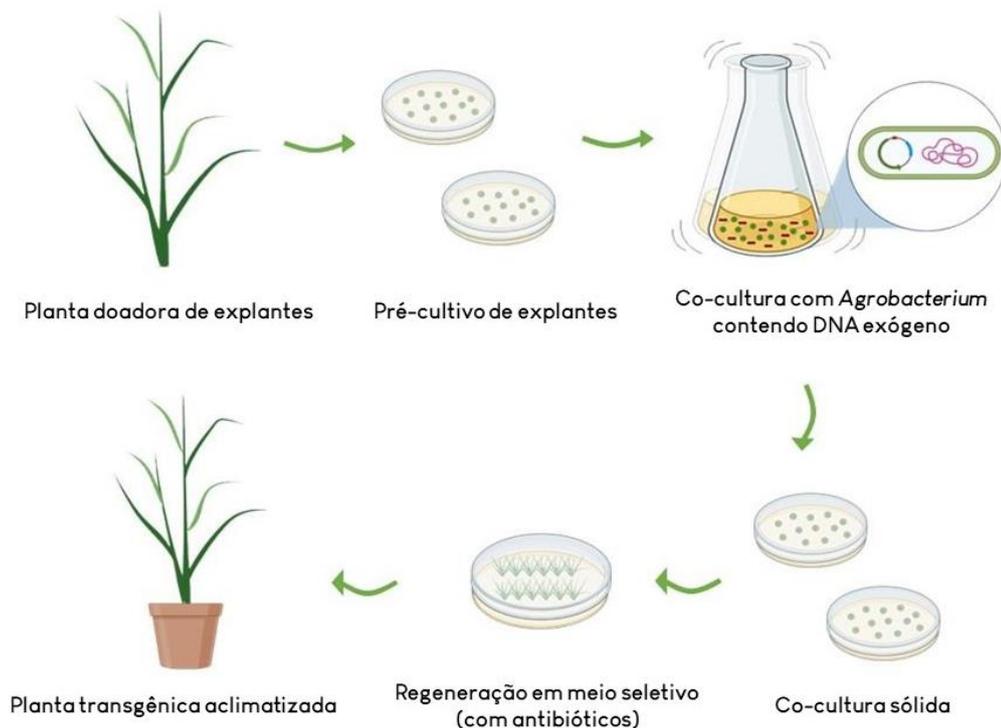


Figura 2. Ilustração das etapas resumidas da obtenção de uma planta transgênica com transformação mediada por *Agrobacterium*. A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é geneticamente modificada para carregar um plasmídeo com um gene de interesse que será inserido no genoma da planta hospedeira por meio da infecção da planta com a bactéria durante o período da co-cultura. O processo de seleção e regeneração é facilitado pela presença de antibióticos, para interromper a infecção; e de auxinas e citocininas, que promovem o crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais infectados e transformados. Fonte: Elaborado pelo autor

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo de regeneração de capim-elefante (*P. purpureum* Schumach syn. *C. purpureus* Schumach cv. BRS Capiáçu) para transformação via *Agrobacterium tumefaciens*.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer explantes *in vitro*, induzir a calogênese e a ES e/ou a organogênese de brotos;
- Identificar a melhor concentração do antibiótico canamicina, como agente de seleção;
- Determinar, via citometria, o período de pré-cultura com maior divisão celular para início da co-cultura.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção, desinfestação e inoculação de explantes

Para a realização deste trabalho, estacas de clones de capim-elefante cv. BRS Capiacu foram coletadas no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco/MG/Brasil. No intuito de remover partículas contaminantes, as estacas da cultivar foram lavadas em água corrente por pelo menos três minutos e cortadas na região de entrenós, os quais foram posteriormente submetidos a banho em etanol (EtOH) 70% (v/v), por dois minutos, seguido de 15 minutos de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO; produto comercial local) a 2% (v/v). Em fluxo laminar, os entrenós foram lavados por seis vezes (1 minuto cada lavagem) em água esterilizada para remoção do excesso de NaClO 2%. Após lavagem, passaram pelo processo de excisão das gemas axilares com auxílio de bisturi e pinça estéreis, sob fluxo laminar. Após a excisão dos explantes, os mesmos foram submetidos às soluções de EtOH 70% por 20 segundos seguida da solução de NaClO 1% por 5 minutos e de lavagem por seis vezes em água estéril. Com o excesso de água removido com auxílio de papel filtro autoclavado, as gemas axilares foram inoculadas em placas contendo meio Murashige e Skoog (MS; MURASHIGE; SKOOG, 1962) (M5519-50L; SIGMA[®], USA) com diferentes suplementações dos reguladores de crescimento 2,4-D (Sigma[®]), BAP (Sigma[®]) e TDZ (Sigma[®]). Os meios utilizados tiveram o pH ajustado para 5,8 e foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos, na pressão de 1,1kg/cm² e na temperatura de 121 °C. Os explantes inoculados foram todos incubados a 25° ± 2°C fotoperíodo de 16 horas e irradiância a 120-125 µmol m⁻² s⁻¹ (lâmpadas brancas LED 6.500K; Avant[®])

4.2 Embriogênese Somática

No estágio de indução de embriões somáticos, as gemas axilares foram inoculadas em placas de Petri (contendo meio de cultivo com 4,4 g.L⁻¹ MS em pó (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 8 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (GSK-GlaxoSmithKline[®]; (v/v); adicionado pós-autoclavagem), 0,1% de *Plant Preservative Mixture* (PPM; *Plant Cell Technology*[®]; (v/v); adicionado pré-autoclavagem) com suplementações dos reguladores de crescimento (RCs) (TABELA 1). Meios com concentração livre de RCs foram utilizados como controle negativo (D0B0T0). Após

14 dias, a porcentagem de calos e da formação de embriões somáticos foram analisadas e os explantes foram recultivados para novas placas contendo os mesmos tratamentos adicionados com 50mM de sulfato de cobre (CuSO₄) por 14 dias adicionais. Apenas o tratamento D4B0.1 foi analisado com 20 dias de indução.

Tabela 1. Tratamentos com reguladores de crescimento utilizados para indução de embriogênese somática em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiáçu

Tratamento	Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)	
	2,4-D	BAP
D0B0T0	0	0
D2B0.5	2	0,5
D2B0.1	2	0,1
D4B0.1	4	0,1

4.3 Indução da Organogênese

Outro estágio de determinação e competência testado focou na formação de múltiplos brotos, contando com a inoculação das gemas axilares em placas contendo meio de cultivo com 4,4 g.L⁻¹ MS em pó (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 6 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (v/v), 0,1% de PPM (v/v) e diferentes combinações dos RCs 2.4-D, BAP e TDZ (TABELA 2). Meios com concentração livre de RCs foram utilizados como controle negativo (D0B0T0). Após 14 de indução, a formação de brotos foi analisada e os explantes foram recultivados, com reanálise aos 28 dias de indução.

4.4 Regeneração de brotos da BRS Capiáçu

Aos 28 dias de indução, os brotos recuperados foram transferidos para potes tipo *babyfood* contendo meio de cultivo com 4,4 g.L⁻¹ MS em pó (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 6 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (v/v), 0,1% de PPM (v/v) por 14 dias para desenvolvimento dos brotos e para a análise das variáveis morfológicas, como raízes e comprimento da parte aérea, e o número de perfilhos formados.

Tabela 2. Tratamentos com reguladores de crescimento utilizados para indução de organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiaçú

Tratamento	Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)		
	2,4-D	BAP	TDZ
D0B0T0	0	0	0
D0.5B2T0	0,5	2	0
D0.1B2T0	0,1	2	0
D0.5B0T2	0,5	0	2
D0.1B0T2	0,1	0	2

4.5 Curva de seleção para transformantes de BRS Capiaçú

Neste estudo, diferentes concentrações do antibiótico canamicina foram acrescidas ao meio de cultura utilizado para regenerar os explantes de capim-elefante cv. BRS Capiaçú (4,4 g.L⁻¹ MS em pó (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 6 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (v/v), 0,1% de PPM (v/v)). A ótima dose-resposta da canamicina para a seleção de células e tecidos transgênicos foi verificada pelo efeito tóxico das diferentes concentrações do antibiótico e pela definição da melhor combinação utilizada na regeneração de brotos. As concentrações de antibióticos utilizados foram de 0 (controle), 25, 50, 75, 100 e 150 mg.L⁻¹. Após 14 dias de cultura, os explantes foram recultivados e, aos 28 dias, foi registrada a capacidade de diferenciação celular e determinação para organogênese de brotos.

4.6 Citometria para análise de taxa proliferativa e definição do período de pré-cultura

As gemas axilares foram expostas em meio de cultivo com o tratamento D0.1B2T0, previamente determinado, e analisadas no intervalo de 0, 2, 3, 4, 5 e 6 dias. Para a análise, 100 mg de material vegetal foram macerados com o auxílio de um bisturi em uma placa de Petri de vidro contendo 300 µL de tampão WPB (LOUREIRO *et al.*, 2007). Após o isolamento dos núcleos, a suspensão foi filtrada por

uma rede de nylon de 30 μm e os núcleos foram corados com 25 μL de iodeto de propídeo (10 mg.mL^{-1}) para a leitura em citômetro e definição das fases G1, S e G2 (CytoFlex[®], Beckman Coulter, Alemanha).

4.7 Análises Estatísticas, confecção de gráficos e ilustrações

Após testes de normalidade (Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov), os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e diferenças significativas foram comparadas usando o teste Tukey a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$) no software GraphPad Prism 8 – também usado para design gráfico. Para a obtenção dos histogramas e a porcentagem de células, foi utilizado o software CytExpert 2.0. As ilustrações foram geradas a partir da adaptação de vetores disponibilizados em <www.biorender.com>. Todos os experimentos foram realizados em, pelo menos, cinco repetições para cada tratamento, com cada repetição contendo no mínimo cinco explantes (n amostral para cada tratamento conforme ANEXO A). Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Indução de calogênese e embriogênese somática

As gemas axilares excisadas dos entrenós de capim-elefante cv. BRS Capiaçú foram submetidas à indução de embriogênese somática e, aos 14 dias de exposição aos reguladores de crescimento (TABELA 1), foi possível observar a proliferação celular e a formação significativa de calos nos explantes dos tratamentos D2B0.5 (FIGURA 3C) e D2B0.1 (FIGURA 3D) em relação ao controle D0B0T0 (FIGURA 3B; FIGURA 3H; TABELA 3). Aos 28 dias, identificou-se o início de uma indução de embriogênese somática com a formação de calos compactos nas combinações D2B0.5 (FIGURA 3F) e D2B0.1 (FIGURA 3G) acrescidas de CuSO_4 em relação ao controle D0B0T0 (FIGURA 3E), entretanto não foram observadas diferenças entre os tratamentos (TABELA 3; FIGURA 3H).

Tabela 3. Proliferação de calos e indução de embriogênese somática em explantes de capim-elefante ‘BRS Capiaçú’ inoculados em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e benzilaminopurina (BAP) nos tempos de 14 e 28 dias. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

Tratamentos	Indução de calogênese e embriogênese somática			
	14 dias		28 dias (+50mM CuSO_4)	
	% calogênese	% ES	% calogênese	% ES
D0B0T0	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^{ns}
D2B0.5	94.44 \pm 0.08 ^a	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	98.75 \pm 0.02 ^a	6.25 \pm 0.09 ^{ns}
D2B0.1	99.88 \pm 0.01 ^a	8.33 \pm 0.13 ^{ns}	98.57 \pm 0.02 ^a	17.85 \pm 0.20 ^{ns}

Dentro da mesma coluna, os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. ES: Embriogênese Somática; (D0B0T0): grupo controle; (D2B0.5): 2 mg.L^{-1} 2,4-D e 0.5 mg.L^{-1} BAP; (D2B0.1): 2 mg.L^{-1} 2,4-D e 0.1 mg.L^{-1} BAP.

A formação de calos semi-friáveis compactos foi observada apenas aos 28 dias de indução, indicando início de ES para os tratamentos com 2 mg.L^{-1} de 2,4-D, entretanto, não houveram diferenças significativas entre as concentrações testadas,

apesar de haver a formação e indução de calos friáveis nas gemas axilares induzidas aos tratamentos (FIGURA 3H).

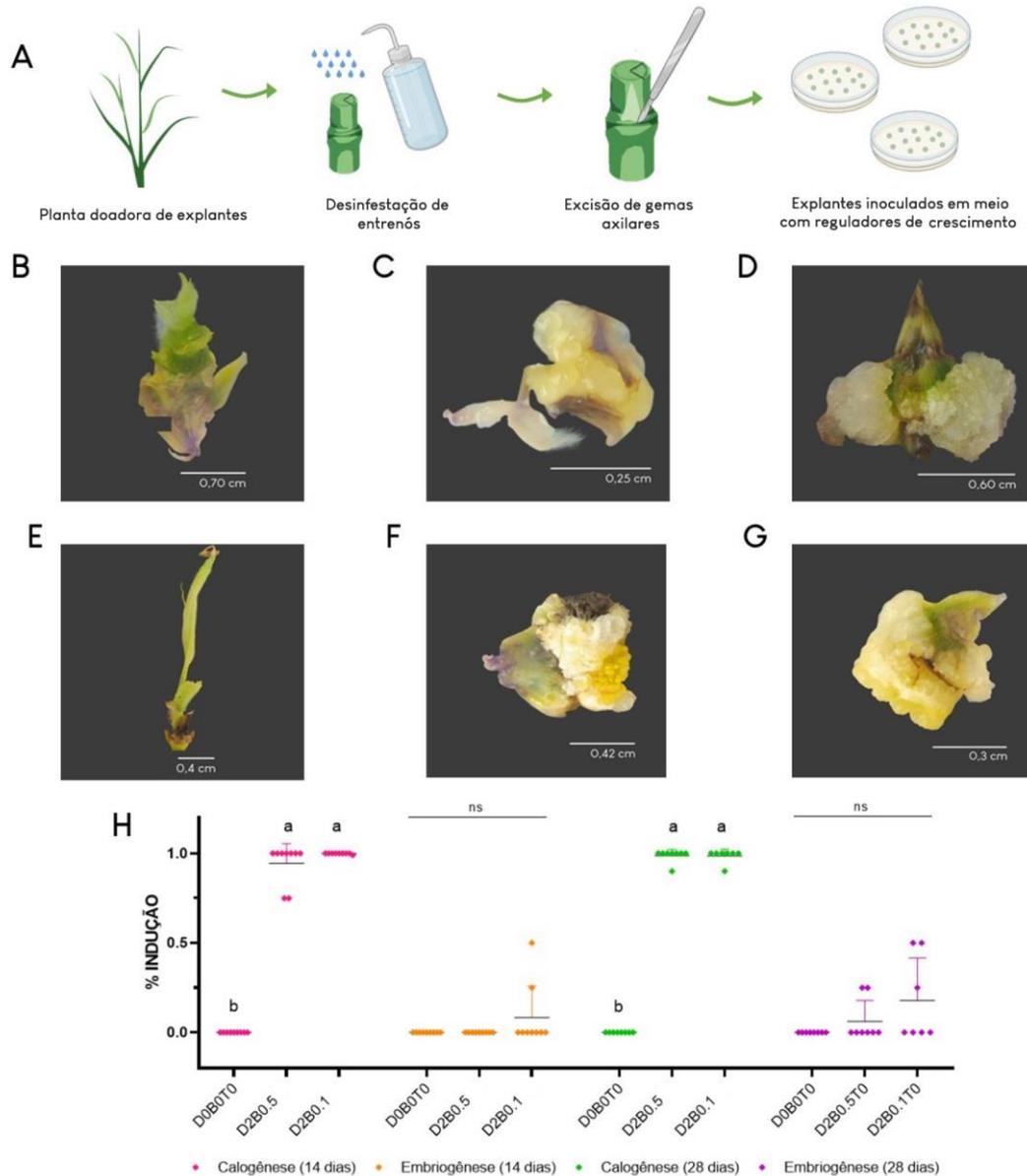


Figura 3. Ilustração da excisão e das gemas axilares e inoculação em meio de cultivo (A). Calos friáveis formados após 14 dias de indução em D2B0.5 (C) e em D2B0.1 (D). Calos compactos foram observados aos 28 dias em D2B0.5 (F) e em D2B0.1 (G). Em (B) e (E) respostas do grupo controle aos 14 e 28 dias, respectivamente. Em (H), dados gráficos do % de indução, em que 0=0% e 1=100%; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Indução da organogênese de brotos múltiplos

As gemas axilares excisadas também foram submetidas à indução de organogênese de brotos por meio do balanço entre a auxina 2,4-D e as citocininas BAP e TDZ. Após os 14 dias de cultivo, comparando com o controle (FIGURA 5A), apesar de não observada múltiplas brotações, foi possível notar o intumescimento das gemas submetidas aos tratamentos D0.5B2T0 (FIGURA 5B), D0.1B2T0 (FIGURA 5C), D0.5B0T2 (FIGURA 5D) e D0.1B0T2 (FIGURA 5E).

Entretanto, aos 28 dias de indução, com exceção do tratamento D0.5B2T0 (FIGURA 5G), foi evidenciada a indução múltipla brotação de forma significativa para os tratamentos D0.1B2T0 (FIGURA 5H), D0.5B0T2 (FIGURA 5I) e D0.1B0T2 (FIGURA 5J). O tratamento D0.1B2T0 pode ser considerado o mais eficaz, induzindo brotos múltiplos em 93% das gemas axilares inoculadas (TABELA 4; FIGURA 5H).

Tabela 4. Indução de organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiapu) inoculados em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ), com análises realizadas aos 14 e 28 dias. Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

Tratamentos	Indução de brotos (%)	
	14 dias	28 dias
D0B0T0	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	0.00 \pm 0.00 ^c
D0.5B2T0	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	32.14 \pm 0.29 ^{bc}
D0.1B2T0	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	93.75 \pm 0.09 ^a
D0.5B0T2	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	33.12 \pm 0.19 ^{bc}
D0.1B0T2	0.00 \pm 0.00 ^{ns}	59.12 \pm 0.15 ^b

Dentro da mesma coluna, os tratamentos com diferentes letras sobreescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. (D0B0T0): grupo controle; (D0.5B2T0): 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.1B2T0): 0,1 mg.L⁻¹ 2,4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.5B0T2): 0,5 mg.L⁻¹ 2,4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.1B0T2): 0,1 mg.L⁻¹ 2,4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ.

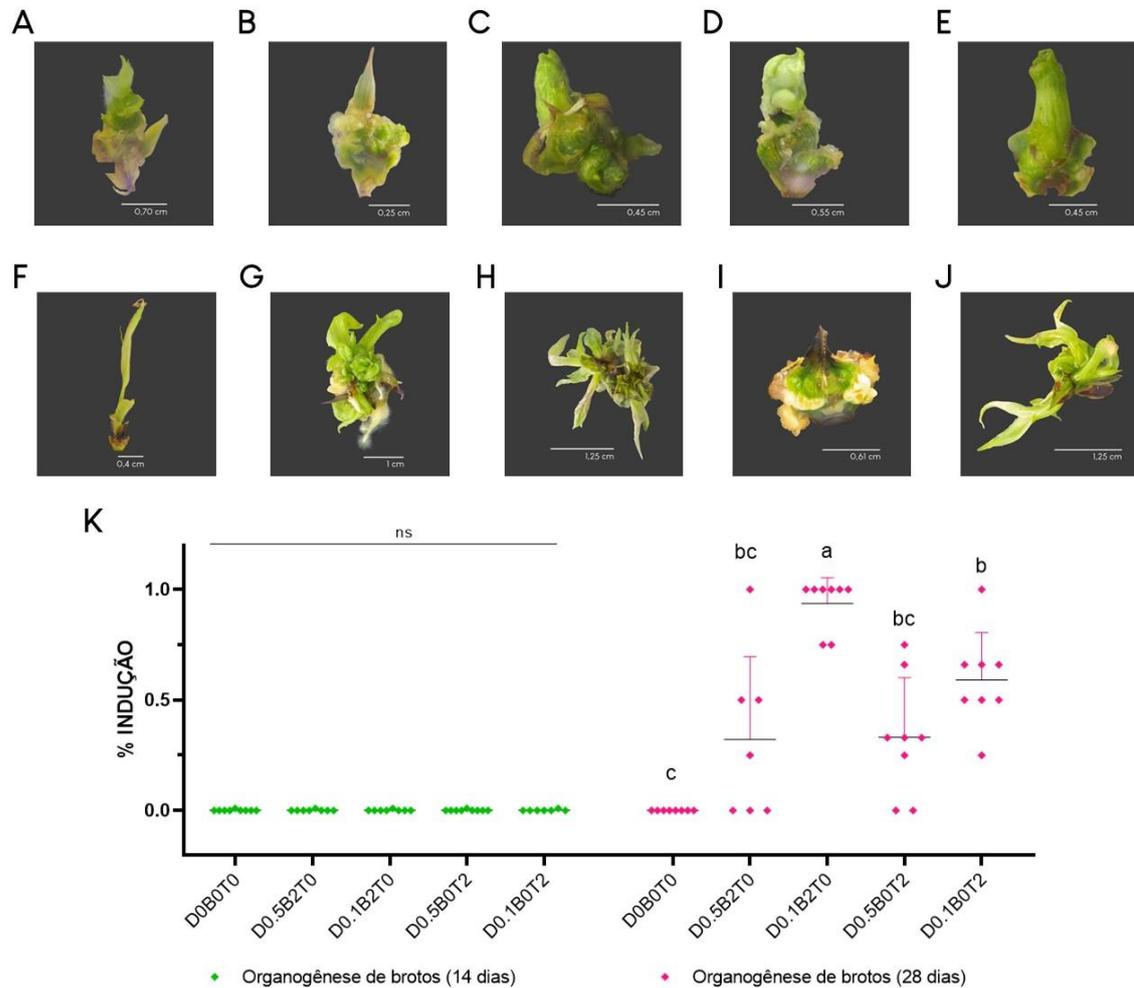


Figura 5. As letras (A), (B), (C), (D), e (E) representam as respostas dos explantes inoculados nos meios D0B0T0, D0.5B2T0, D0.1B2T0, D0.5B0T2 e D0.1B0T2 após 14 dias, enquanto que as letras (F), (G), (H), (I), e (J) mostram as respostas dos explantes inoculados nos meios D0B0T0, D0.5B2T0, D0.1B2T0, D0.5B0T2 e D0.1B0T2 após 28 dias, respectivamente. Em (K), dados gráficos do desenvolvimento de brotos ao longo de 14 e 28 dias e indicam 0=0% e 1=100% de indução; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Regeneração de brotos múltiplos

Foi possível observar a formação de elevada frequência de brotos múltiplos a partir da indução das gemas axilares da cv. BRS Capiáçu, com desenvolvimento eficiente de perfilhos e com um alongamento de parte aérea e enraizamento de plantas submetidas aos tratamentos D0.5B2T0 e D0.1B2T0 condizente com o desenvolvimento observado em explantes do grupo controle D0B0T0 (TABELA 5).

Tabela 5. Análises morfológicas realizadas após o cultivo por 14 dias de brotos múltiplos recuperados a partir da exposição de gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiáçu) em diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ). Dados apresentados em média \pm desvio padrão.

Tratamentos	Variáveis analisadas		
	No. de perfilhos	Raiz (cm)	Parte aérea (cm)
D0B0T0	1.00 \pm 0.47 ^b	12.84 \pm 6.56 ^a	3.80 \pm 1.35 ^a
D0.5B2T0	6 \pm 2.40 ^{ab}	9.30 \pm 2.20 ^{ab}	2.88 \pm 0.34 ^a
D0.1B2T0	5.8 \pm 3.06 ^{ab}	6.77 \pm 3.52 ^{bc}	3,09 \pm 1.08 ^a
D0.5B0T2	6.6 \pm 0.95 ^{ab}	3.06 \pm 2.95 ^{cd}	1.55 \pm 0.30 ^b
D0.1B0T2	5.7 \pm 3.87 ^{ab}	0.58 \pm 1.00 ^d	1.17 \pm 0.46 ^b

Dentro da mesma coluna, os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$, enquanto valores seguidos por (ns) denotam resultados não significativos no teste de Tukey. (D0B0T0): grupo controle; (D0.5B2T0): 0,5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.1B2T0): 0,1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.5B0T2): 0,5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ; (D0.1B0T2): 0,1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ.

Com os 14 dias de cultivo de brotos recuperados, os explantes foram analisados quanto às diferentes respostas de exposição: para o tratamento D0.5B2T0 (FIGURA 6B) não houveram diferenças estatísticas com o controle (FIGURA 6A) para as variáveis comprimento da raiz (cm) e da parte aérea (cm), entretanto, a regeneração de brotos múltiplos não foi eficiente, com número de perfilhos gerados estatisticamente igual ao de plantas controle (FIGURAS 6F-6H). Para o tratamento D0.1B2T0, a regeneração múltipla foi evidenciada, com grande número de perfilhos e elevado comprimento de parte aérea, assim como plantas controle, apesar de raízes mais curtas (FIGURA 6C; FIGURAS 6F-6H). Para os

tratamentos com TDZ, D0.5B0T2 (FIGURA 6D) e D0.1B0T2 (FIGURA 6E), houve um menor desenvolvimento dos entrenós e das raízes (FIGURAS 6F-6H).

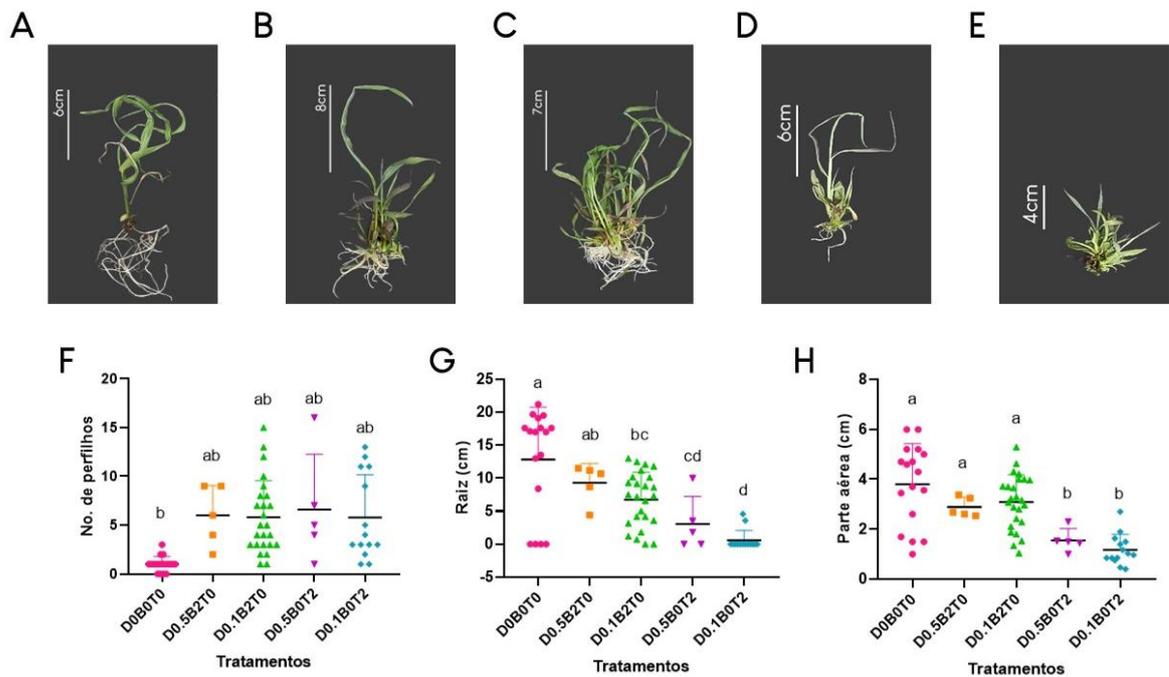


Figura 6. Variações morfológicas observadas após a regeneração de gemas axilares de BRS Capiçu expostas a diferentes combinações de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), benzilaminopurina (BAP) e thiodiozuron (TDZ) hormônios. Em (A) meio livre de hormônio (D0B0T0), em (B) 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ (D0.5B2T0), em (C) 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 2 mg.L⁻¹ BAP; 0 mg.L⁻¹ TDZ (D0.1B2T0), em (D) 0.5 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ (D0.5B0T2) e em (E) 0.1 mg.L⁻¹ 2.4-D; 0 mg.L⁻¹ BAP; 2 mg.L⁻¹ TDZ (D0.1B0T2). Em (F), (G), e (H) as variáveis ‘número de perfilhos’, ‘comprimento da raiz’ e ‘comprimento da parte aérea’ foram, respectivamente, analisadas. os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com p<0,05 no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 Curva de seleção

Durante os primeiros quatro dias de exposição ao agente de seleção canamina, os explantes apresentaram intumescimento e bom desenvolvimento, entretanto, após deste período aos 14 dias de indução foi observada o início da mortalidade em alguns explantes nos tratamentos com concentrações de canamicina superiores a 75 mg.L⁻¹ (D0.1B2T0K75, B0.1B2T0K100, D0.1B2T0K150), com taxas de mortalidade observada entre 60-80% significativas a $p < 0,05$ (FIGURA 7). Diferentemente dos tratamentos com concentrações superiores a 75 mg.L⁻¹, os tratamentos de 25 e de 50 mg.L⁻¹ (D0.1B2T0K25 e D0.1B2T0K50, respectivamente), apesar de reduzirem a regeneração de 30% a 40%, permitiram o desenvolvimento de forma seletiva de brotos, com a formação de parte aérea aclorofilada (FIGURA 7).

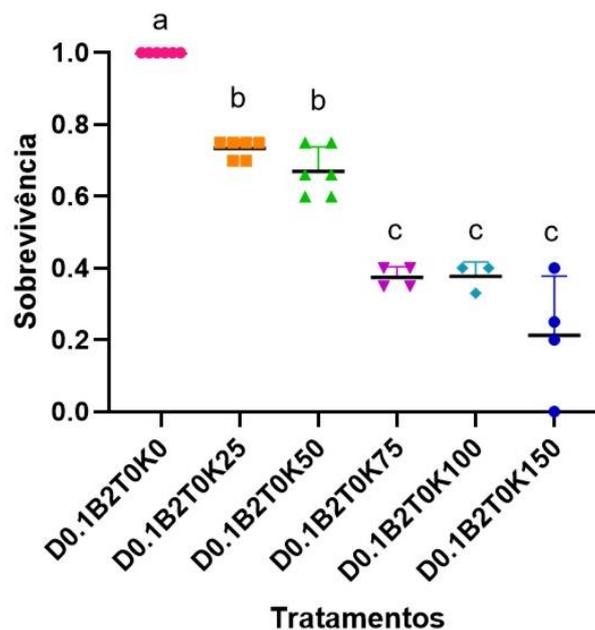


Figura 7. Respostas das gemas axilares de capim-elefante (cultivar BRS Capiáçu) expostas por 14 dias em meio de regeneração de brotos D0.1B2T0 contendo diferentes concentrações de canamicina. Dados representados em % de sobrevivência em que o eixo y indica 0=0% e 1=100%; os tratamentos com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente com $p < 0,05$ no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Dinâmica do Ciclo Celular e determinação do período de pré-cultura

Com os histogramas obtidos pela análise de citometria de fluxo, foi possível detectar a dinâmica do ciclo celular em diferentes tempos *in vitro*, revelando um aumento significativo nos valores do pico da fase S no terceiro dia de pré-cultura (PC3) com a proporção de células na fase S atingindo um pico de 6% dos eventos analisados e decaindo conforme o tempo de pré-cultura (FIGURA 8).

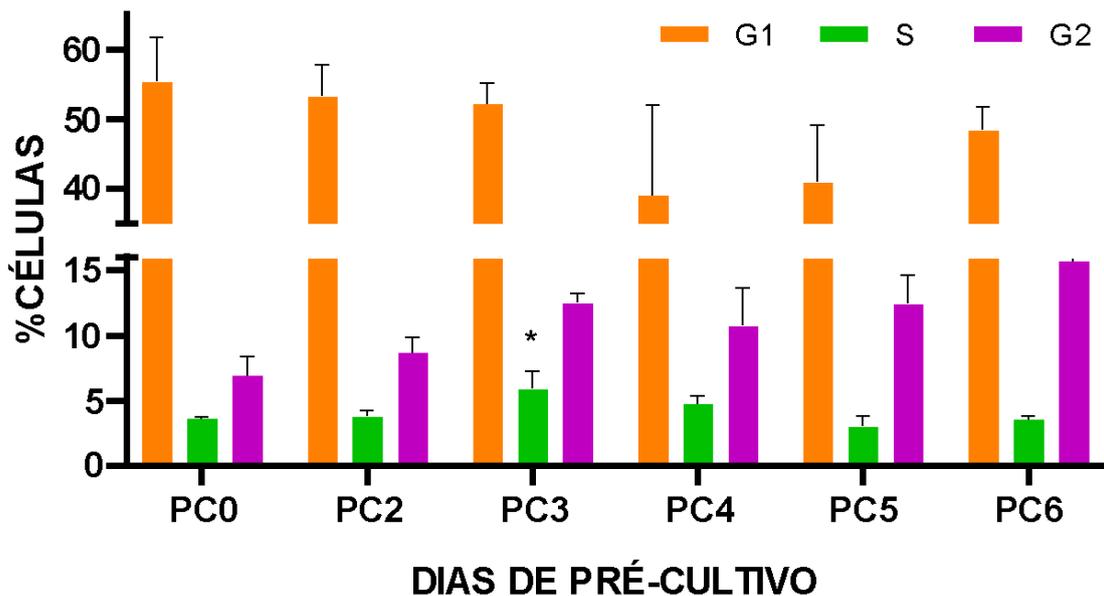


Figura 8. Dinâmica do ciclo celular observado em gemas axilares pré-tratadas com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ 2.4-D; 2 mg.L^{-1} BAP; 0 mg.L^{-1} TDZ (D0.1B2T0), com o percentual de células nos ciclos celulares G1, S e G2 analisado, via citometria de fluxo nos tempos de 0 (PC0) 2 (PC2), 3 (PC3), 4 (PC4) e 5 (PC5) e 6 (PC6) dias de pré-tratamento. Os tratamentos com (*) diferem significativamente com $p < 0,05$ no teste de Tukey. Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Apesar de indução de calogênese nos tratamentos com 2,4-D, BAP e TDZ aqui utilizados, não foi possível relatar a persistência dos tratamentos na formação e sustentação de ES (embriogênese repetitiva), com calos compactos formados, significativamente, apenas no tratamento com D4B0.1 (FIGURA 3H; FIGURA 4B; FIGURA 4C). Em estudos de indução de ES de outras espécies, houve um aumento e crescimento relativo de calos quando combinando a citocinina BAP com maiores concentrações de 2,4-D, podendo vir a ser uma expectativa futura para obtenção de embriões somáticos (CAPRIOTTI *et al.*, 2022).

Embora não observada a persistência na formação de calos compactos nos tempos de indução, o 2,4-D, em concentrações mais altas variando de 2-10 mg.L⁻¹, é comumente utilizado para a formação de calos e de embriões somáticos em gramíneas e, quando combinado com baixas concentrações de citocininas e de CuSO₄ (50mM), pode controlar a ES e induzir pré-embriões compactos com maior manutenção no potencial de regeneração da cultura (MUGUERZA *et al.*, 2022).

Outro fator observado para o tratamento D4B0.1 foi a relação entre o tamanho das gemas inoculadas, em que as maiores gemas axilares (~1cm de largura) apresentaram uma maior indução de calos friáveis e semi-friáveis em comparação com as gemas de menor tamanho, que foram mais facilmente induzidos à formação de calos compactos de aparência embriogênica (FIGURA 4A-C; dados não analisados em relação ao tamanho dos explantes).

Com a formação de embriões somáticos de baixa manutenção em cultura para regeneração de uma planta por inteiro, neste trabalho, gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiáçu foram regeneradas com o estabelecimento de um protocolo eficiente no que tange à indução de brotos múltiplos, em que o tratamento D0.1B2T0 foi responsável por 93 % da indução de brotos múltiplos a partir das gemas axilares laterais (TABELA 4). A ótima taxa de indução de múltiplos brotos com o uso da concentração de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D também é relatada para outras espécies (GOSWAMI *et al.*, 2022; LING *et al.*, 2018).

A cultura de múltiplos brotos a partir do aumento de citocininas em relação a auxinas após a embriogênese é uma opção viável para a regeneração de plantas, visto que a capacidade de indução de brotos pode ser feita a partir de embriões somáticos (GONDO *et al.*, 2017). Quanto ao múltiplo brotamento, os tratamentos com

BAP a 2 mg.L⁻¹, em detrimento do TDZ a 2 mg.L⁻¹, foram capazes de maior regeneração de brotos atrelada ao desenvolvimento radicular (TABELA 4; FIGURA 5; FIGURA 6B-C).

Considerando a menor taxa de formação de perfilhos e de parte aérea para os tratamentos com TDZ (TABELA 5), podem ser realizadas segundas induções com a citocinina BAP: Enkhbileg, Fári e Kurucz (2019) obtiveram maior regeneração e proliferação de perfilhos nos brotos induzidos com TDZ com posterior desenvolvimento radicular em uma segunda indução com uso da citocinina BAP. Ademais, menores concentrações podem ser eventualmente testadas, visto que o uso de concentrações de TDZ superiores a 0,75 mg.L⁻¹ estão relacionadas com reduções no conteúdo total de clorofilas e de carotenoides (DOGAN, 2019).

O estabelecimento de um sistema de transformação efetivo envolve a edição de genoma com a introdução do material genético de interesse agrícola – ou até mesmo farmacêutico - por meio de vários métodos, como a transformação mediada por *Agrobacterium* que, geralmente, é configurada de forma a apresentar um vetor com resistência a antibióticos como agente de seleção de células transformadas (TALAKAYALA; KATTA. 2020; TYAGI *et al.*, 2020; POLOWICK; YAN, 2023).

O processo de otimização da concentração do antibiótico no período pós-cultura é crítico para estabelecer a eficiência do sistema de transformação, uma vez que o uso excessivo de antibióticos prejudica o desenvolvimento de brotos e de tecidos transformados com eventual formação de necrose, enquanto que doses baixas podem resultar em uma alta frequência de escapes e na formação de quimeras (VERMA; KUMAR; MODGIL, 2023).

A canamicina é o agente de seleção mais comumente utilizado para a seleção e recuperação de plantas transgênicas e, uma vez que a concentração é variável conforme a espécie de planta a ser transformada, existe a necessidade de padronização da melhor concentração a ser utilizada (VERMA; KUMAR; MODGIL, 2023). As gemas axilares que foram inoculadas em meios de cultura com tratamentos nas concentrações de 25 e 50 mg.L⁻¹ de canamicina, além de não diferirem com o controle D0.1B2T0K0 na capacidade de diferenciação de múltiplos brotos, apresentaram folhas cloróticas que permitem a seleção de escapes de células não transformadas (imagens de folhas cloróticas não mostradas) (FIGURA 7).

A canamicina se liga à subunidade ribossomal 30S no cloroplasto e na mitocôndria das células vegetais, interferindo na síntese proteica e resultando em

aspectos cloróticos (VERMA; KUMAR; MODGIL, 2023). Os tratamentos com concentrações acima de 75 mg.L⁻¹ apresentaram respostas fenotípicas mais estressantes, impactando na diferenciação em broto em relação ao controle e limitando o crescimento, causando necrose e morte tecidual dos explantes inoculados (FIGURA 7).

Assim, consideramos o tratamento D0.1B2T0K50 ideal, uma vez que permitiu o desenvolvimento de múltiplas brotações com limitações fenotípicas em relação ao controle. Os resultados aqui observados foram similares aos de Polowick e Yan (2023), que relatam a importância da curva de seleção para evitar escape de brotos não transgênicos, em que a concentração de 20 mg.L⁻¹ de canamicina permitiu o desenvolvimento de brotos de forma selecionada.

O método de transformação de plantas mediado por *Agrobacterium* é eficiente e prático, entretanto, ainda é desafiador executar protocolos de seleção e regeneração eficientes (NIEDBALA; NIAZIAN; SABBATINI, 2021). Assim, considerando a inserção aleatória do transgene pela *A. tumefaciens* em um período de alta taxa proliferativa, também foi realizada a análise da dinâmica do ciclo celular, via citometria de fluxo, para estabelecer o dia de pré-cultura com maiores taxas de divisão celular visando os procedimentos de co-cultura para transformação genética (XIA *et al.*, 2023).

Células vegetais em fase ativa são mais receptivas à incorporação de material genético e podem ser mais competentes e mais facilmente transformadas pela *Agrobacterium* (XIA *et al.*, 2023). Considerando que a fase S do ciclo celular é marcada por um metabolismo celular mais ativo, avaliamos o período de pré-cultivo no tratamento D0.1B2T0 em que existe uma maior proporção de células em divisão (fase S) durante o pré-cultivo PC3 (FIGURA 8) (XIA *et al.*, 2023).

O período de pré-cultivo induz divisões celulares que propiciam a incorporação do material genético exógeno e, apesar de serem relatadas diferentes períodos de pré-cultivo – de forma a aumentar a taxa e a eficácia da transformação –, como de 2 dias e de 4 dias (LI *et al.*, 2018; SANDHYA *et al.*, 2022). Neste trabalho, para capim-elefante cv. BRS Capiáçu, um pré-cultivo de 3 dias é, muito provavelmente, o mais eficaz para aumentar a taxa de transformação genética usando *Agrobacterium*.

7 CONCLUSÃO

A embriogênese somática foi observada aos vinte dias de indução de gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiapu no tratamento D4B0.1, o qual demonstrou ser o mais eficiente para indução de calos compactos. Quanto à indução de organogênese de brotos, as gemas inoculadas em tratamento D0.1B2T0 apresentaram a melhor taxa de regeneração, com 93% de brotos múltiplos formados, com bom desenvolvimento radicular e de parte aérea. Para a curva de seleção, o meio de indução contendo 50 mg.L^{-1} do antibiótico canamicina (D0.1B2T0K50) foi efetivo para o desenvolvimento de broto e a seleção de células não transformadas com alterações fenotípicas cloróticas. A maior atividade celular foi analisada por citometria de fluxo e indicou um percentual significativo de células ativas na fase S do ciclo celular no pré-cultivo de 3 dias (PC3).

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Analisar outros parâmetros envolvidos no processo de co-cultura a fim de influenciar positivamente na eficiência da transformação, como OD₆₀₀ da *Agrobacterium*, o período de incubação e de co-cultivo. Essas investigações se tornam indispensáveis para o estabelecimento de um protocolo otimizado de transformação de capim-elefante cv. BRS Capiáçu.

Ademais, alternativas para a indução de embriogênese somática se fazem necessárias, como o subcultivo de embriões somáticos diferentes condições de luminosidade.

9 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, R. *et al.* Tolerance to nymphs and adults of *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) by forage plants in fertilized soils. **Pest Management Science**, v. 75, n. 8, p. 2242-2250, 2019.

AMARAL, R. C. *et al.* Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiaçú. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114472, 2020.

ASADI-AGHBOLAGHI, M. *et al.* Protocol development for somatic embryogenesis, SSR markers and genetic modification of *Stipagrostis pennata* (Trin.) De Winter. **Plant Methods**, v. 17, n. 1, p. 70, 2021.

ASGHAR, S. *et al.* Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. **Plant Growth Regulation**, p. 1-16, 2022.

BINNS, A. N.; ZHAO, J. The MexE/MexF/AmeC efflux pump of *Agrobacterium tumefaciens* and its role in Ti plasmid virulence gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 202, n. 8, p. e00609-19, 2020.

CAPRIOTTI, L. *et al.* Efficient protocol of de novo shoot organogenesis from somatic embryos for grapevine genetic transformation. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1172758, 2023.

CAPRIOTTI, L. *et al.* From induction to embryo proliferation: improved somatic embryogenesis protocol in grapevine for Italian cultivars and hybrid *Vitis rootstocks*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 151, n. 2, p. 221-233, 2022.

CARNEIRO, A. A. *et al.* Indução de culturas de raízes por diferentes linhagens de *Agrobacterium rhizogenes* em plântulas de *Cichorium intybus*, *Daucus carota*, *Macroptilium atropurpureum* e *Plantago* sp. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, ISSN 1679-0154; 197, 26 p, 2019.

CHAMBHARE, M. R.; NIKAM, T. D. Influence of plant growth regulators on somatic embryogenesis in Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.): an edible oilseed crop. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 225-232, 2022.

CONGIO, G. F. Souza *et al.* Spittlebug damage on tropical grass and its impact in pasture-based beef production systems. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

DESSOKY, E. S. *et al.* Improvement of sugarcane for borer resistance using *Agrobacterium* mediated transformation of cry1Ac gene. **GM Crops & Food**, v. 12, n. 1, p. 47-56, 2021.

DOGAN, M. Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 29, n. 2, 2019.

ENKHBILEG, E.; FÁRI, M. G.; KURUCZ, E. *In vitro* effect of different cytokinin types (BAP, TDZ) on two different *Ocimum basilicum* cultivars explants. **International Journal of Horticultural Science**, v. 25, n. 3-4, p. 15-20., 2019.

GELVIN, Stanton B. Integration of Agrobacterium T-DNA into the plant genome. **Annual review of genetics**, 51: 195-217, 2017.

GONDO, T. *et al.* Plant regeneration from embryogenic callus derived from shoot apices and production of transgenic plants by particle inflow gun in dwarf napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach.). **Plant Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 143-150, 2017.

GOSWAMI, B. *et al.* In Vitro Regeneration of Aromatic Rice (*Oryza Sativa* L. Var. Doairgura). **Bangladesh Journal of Botany**, v. 51, n. 4, p. 677-682, 2022.

HNATUSZKO-KONKA, K. *et al.* Cytokinin signaling and de novo shoot organogenesis. **Genes**, 12.2: 265, 2021.

IBRAHIM, M. A.; DRAAJ, I. A. The effect of explant source and cytokinin concentration on the direct bulb formation of tulip (*Tulipa gesnerina* L.) by plant tissue culture technique. **Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol**, v. 21, p. 111-119, 2020.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. **The plant cell**, 25.9: 3159-3173, 2013.

IQBAL, A. *et al.* Genetic engineering approaches for enhanced insect pest resistance in sugarcane. **Molecular Biotechnology**, v. 63, n. 7, p. 557-568, 2021.

ISAH, T.; UMAR, S. Influence of silver nitrate and copper sulfate on somatic embryogenesis, shoot morphogenesis, multiplication, and associated physiological biochemical changes in *Gladiolus hybridus* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 149, n. 3, p. 563-587, 2022.

KAMATHAM, S. *et al.* Recent advances in engineering crop plants for resistance to insect pests. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, p. 1-14, 2021.

KUMAR, A. U.; LING, A. P. K. Gene introduction approaches in chloroplast transformation and its applications. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2021.

LEAL, D. B. *et al.* Correlações entre as características produtivas e nutricionais do capim-BRS capiaçu manejado na região semiárida. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 18951-18960, 2020.

LEÓN, E. B.; REINIGER, L. R. S.; SILVA, K. B. Efeito de diferentes fontes e concentrações de citocinina na multiplicação in vitro de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Investigación Agraria**, v. 22, n. 2, p. 63-69, 2020.

LESTARI, N. W. D. *et al.* Callus and shoot induction of leaf culture *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. **Nusantara Bioscience**, v. 11, n. 2, 2019.

LI, S, *et al.* Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. **Plant cell reports**, v. 40, p. 271-282, 2021.

LI, X. *et al.* In vitro regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *D. lotus* (*Diospyros lotus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 229-237, 2018.

LING, W. T. *et al.* Shoot induction from axillary shoot tip explants of fig (*Ficus carica*) cv. Japanese BTM 6. **Tropical life sciences research**, v. 29, n. 2, p. 165, 2018.

LOUREIRO, J. *et al.* Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. **Annals of Botany**, n. 1995, p. 875–888, 2007.

MELO, B. P. *et al.* Soybean embryonic axis transformation: combining biolistic and *Agrobacterium*-mediated protocols to overcome typical complications of in vitro plant regeneration. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1228, 2020.

MONÇÃO, F. P. *et al.* Productivity and nutritional value of BRS capiaçu grass (*Pennisetum purpureum*) managed at four regrowth ages in a semiarid region. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 235-241, 2020.

MONTESINOS, J. C., *et al.* Phytohormone cytokinin guides microtubule dynamics during cell progression from proliferative to differentiated stage. **The EMBO Journal**, 39.17: e104238, 2020.

MUGUERZA, M. B. *et al.* Tissue culture and somatic embryogenesis in warm-season grasses - Current status and its applications: A review. **Plants**, v. 11, n. 9, p. 1263, 2022.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Plant Physiology**, 15, 473-497, 1962.

MUTHI'AH, A., *et al.* Callus induction of *Calotropis gigantea* using BAP and 2, 4-D in vitro. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2023. p. 012021.

NICOLAS, A.; LAUFS, P. Meristem initiation and de novo stem cell formation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

NIEDBALA, G.; NIAZIAN, M.; SABBATINI, P. Modeling *Agrobacterium*-mediated gene transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*)—a model plant for gene transformation studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 695110, 2021.

OZYIGIT, I. I.; KURTOGLU, K. Y. Particle bombardment technology and its applications in plants. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 9831-9847, 2020.

PEREIRA, A. V. BRS CAPIAÇU E BRS KURUMI: cultivo e uso - Brasília, DF: Embrapa, 2021.

PEREIRA, A. V. *et al.* Elephantgrass, a tropical grass for cutting and grazing. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 3, p. 1-13, 2021.

PEREIRA, A. V.; LÉDO, F. J. S.; MACHADO, J. C. BRS Kurumi and BRS Capiaçú-New elephant grass cultivars for grazing and cut-and-carry system. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 59-62, 2017.

PETTI, C. Phloroglucinol Mediated Plant Regeneration of *Ornithogalum dubium* as the Sole "Hormone-Like Supplement" in Plant Tissue Culture Long-Term Experiments. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 929, 2020.

POLOWICK, P. L.; YAN, W. A protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Lens culinaris* Medik (lentil). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 152, n. 3, p. 605-618, 2023.

RAMOS, G. K. *et al.* CALOGÊNESE in vitro EM EXPLANTES FLORAIS DE CUPUAÇU USANDO THIDIAZURON E ÁCIDO 2, 4-DICLOROFENOXIACÉTICO. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, 14.26, 2017.

REIS, L. *et al.* Combinações hormonais na organogênese cotiledonar do meloeiro cv. Eldorado 300. **Revista Cultivando o Saber**, v. 12, n. 4, p. 66-76, 2019.

RETORE, M. *et al.* Manejo do capim BRS Capiaçú para aliar produtividade à qualidade. **Embrapa Agropecuária Oeste-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2021.

ROSA, P. P. *et al.* Características do Capim Elefante *Pennisetum purpureum* (Schumach) e suas novas cultivares BRS Kurumi e BRS Capiaçú. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 1/2, p. 70-84, 2019.

SANDHYA, D. *et al.* Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 6, p. 103292, 2022.

SARAIVA, N. B. *et al.* Molecular profiling of the *Mahanarva spectabilis* salivary glands and phytohormonal response of elephant grass. **International Journal of Tropical of Insect Science**, v. 41, p. 849-860, 2021.

SARKAR, S.; JHA, S. Effects associated with insertion of rol genes on morphogenic potential in explants derived from transgenic *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 146, n. 3, p. 541-552, 2021.

SCHÖBEL, C.; CARVALHO, Gervasio S. The “state of art” of *Mahanarva* (Hemiptera: Cercopidae) research. An economically important New World spittlebug genus. **Applied Entomology and Zoology**, v. 56, p. 299-309, 2021.

SHIN, J.; BAE, S.; SEO, P. J. De novo shoot organogenesis during plant regeneration. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 63-72, 2020.

SMITH, C. M. Conventional breeding of insect-resistant crop plants: still the best way to feed the world population. **Current Opinion in Insect Science**, v. 45, p. 7-13, 2021.

SOOD, P.; SINGH, R. K.; PRASAD, M. Millets genetic engineering: the progress made and prospects for the future. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, p. 421-439, 2019.

SUTRADHAR, M.; MANDAL, N. Reasons and riddance of *Agrobacterium tumefaciens* overgrowth in plant transformation. **Transgenic Research**, p. 1-20, 2023.

TALAKAYALA, A.; KATTA, S.; GARLADINNE, M. Genetic engineering of crops for insect resistance: An overview. **Journal of Biosciences**, v. 45, n. 1, p. 114, 2020.

THOMPSON, M. G. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*: A bacterium primed for synthetic biology. **BioDesign Research**, 2020.

TYAGI, S. *et al.* Genome editing for resistance to insect pests: an emerging tool for crop improvement. **ACS Omega**, v. 5, n. 33, p. 20674-20683, 2020.

UMAMI, N. *et al.* Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from the Apical Meristem of Wrukwona Napiergrass (*Pennisetum purpureum*) Treated with Thidiazuron and Cupric Sulfate. **Tropical Animal Science Journal**, v. 45, n. 2, p. 220-226, 2022.

VERMA, S.; KUMAR, A.; MODGIL, M. Impact of cefotaxime and kanamycin on in vitro regeneration via *Agrobacterium* mediated transformation in apple cv. Red Chief. **Plant Physiology Reports**, p. 1-9, 2023.

XIA, Y. *et al.* Effect of a suitable treatment period on the genetic transformation efficiency of the plant leaf disc method. **Plant Methods**, v. 19, n. 1, p. 15, 2023.

ZAFAR, M. M. *et al.* Heterologous expression of cry3Bb1 and cry3 genes for enhanced resistance against insect pests in cotton. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 10878, 2022.

ZAYTSEVA, Y. G.; AMBROS, E. V.; NOVIKOVA, T. I. Meta-topolin: advantages and disadvantages for in vitro propagation. **Meta-topolin: a growth regulator for plant biotechnology and agriculture**, p. 119-141, 2021.

Capítulo II. *Nicotiana benthamiana* HOMOZIGOTAS TRANSGÊNICAS COMO PLATAFORMA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES scFAB PARA IL-1 β

1 INTRODUÇÃO

A grande demanda custosa e laboriosa de proteínas biofarmacêuticas pode ser suprida por estratégias de produção de proteínas heterólogas/recombinantes em plataformas que utilizam células bacterianas, fúngicas, animais ou vegetais transformadas para expressão de um gene exógeno no intuito de se obter, após processos *downstream*, grandes quantidades dessa macromolécula de interesse (CAI *et al.*, 2019; BERINI; MARINELLI; BINDA, 2020; KORPYS-WOŹNIAK *et al.*, 2020; CHEN; LI; LIU, 2021; GHAG *et al.*, 2021).

As plantas são biofábricas seguras para a expressão heteróloga de compostos e oferecem vantagens em relação às outras plataformas de produção por serem livres de toxinas e de patógenos replicantes em humanos, além de serem altamente eficientes para produção em larga escala (BURNETT; BURNETT, 2020). A estabilidade da expressão e herança do transgene é desejável para o sucesso da comercialização de proteínas heterólogas, podendo essa característica ser obtida por meio da obtenção de progênies homozigotas para o transgene (OHNOUTKOVÁ; VLČKO, 2020; MIRZAEI *et al.*, 2021; KAMMAR *et al.*, 2023).

A produção de anticorpos em plantas, apesar de complexa por demandar da produção de pelo menos dois tipos de estruturas polipeptídicas unidas por um *linker* com correta montagem e modificações para bioatividade da proteína, é caracterizada pela funcionalidade de anticorpos monoclonais (mAbs) e suas variantes, como fragmento de anticorpo de cadeia única de ligação ao antígeno (scFAB) e fragmentos variáveis de anticorpo de cadeia única (scFv) (KOPERTEKH *et al.*, 2019; SATHEESHKUMAR, 2020; CHEN, 2022).

Os mAbs marcam moléculas específicas e oferecem uma terapia mais direcionada em comparação com tratamentos tradicionais e, com isso, impactaram significativamente na resolução de doenças inflamatórias (POSNER *et al.*, 2019). O processo inflamatório pode ser mediado por vários fatores, sendo as citocinas da família IL-1 um dos principais fatores inflamatórios e causador de doenças,

caracterizadas por febres correntes, inflamações sistêmicas e disfunções do sistema imunológico inato (HAUSMANN, 2019; ZHENG *et al.*, 2019).

Para o tratamento de doenças inflamatórias causadas pela citocina interleucina-1 (IL-1) são utilizados, atualmente, os medicamentos Anakinra, Canakinumab, Rilonacept e Gevokizumab para bloqueio da ação da molécula, reduzindo eventos cardiovasculares e a produção de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, reduzindo a resposta inflamatória (ZHENG *et al.*, 2019). O anticorpo Canakinumab inibe a interleucina IL-1 β na cascata inflamatória e é frequentemente utilizado para tratamento de distúrbios autoimunes – como artrite reumática –, com valores de US\$ 73.000,00 por ano para 150 mg administrados a cada 3 meses (SEEHESTED *et al.*, 2019).

O alto custo e dificuldade de produção em larga escala desses medicamentos limitam o seu acesso em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos e, assim, as plantas apresentam uma solução plausível de maior viabilidade e acessibilidade para produção de vacinas, anticorpos e medicamentos, com economias de 10 milhões de euros em escalas de produção quando comparados a produção em sistemas de células mamíferas (BUYEL, 2019; SHANMUGARAJ; BULAON; PHOOLCHAROEN, 2020).

Nesta dissertação, plantas de *Nicotiana benthamiana* hemizigotas transformadas de forma estável para a produção de scFAB-anti-IL1 β por Aragão (2022) foram autopolinizadas para a obtenção de plantas homozigotas, objetivando a seleção de linhagens transgênicas produtoras de um anticorpo recombinante de cadeia simples scFAB-anti-IL1 β .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A citocina IL-1 β e a relação com doenças inflamatórias

O processo inflamatório é induzido por diversos fatores variáveis e surge como um mecanismo de defesa para o reparo de danos causados por corpos estranhos, como patógenos e compostos tóxicos (HUANG *et al.*, 2021). Com o reconhecimento do estímulo, a ativação da resposta inflamatória leva ao recrutamento de células e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como as citocinas da família da IL-1 (HUANG *et al.*, 2021).

As interleucinas apresentam papel essencial nas respostas inflamatórias e encontram-se relacionadas com a maturação, diferenciação, migração e adesão de células imunes, regulando respostas inatas e adaptativas e mantendo uma homeostase endógena que, quando perturbada, resulta em respostas inflamatórias patológicas que podem ocasionar dermatoses e, em casos mais graves, cânceres (HUANG *et al.*, 2021; IZNARDO; PUIG, 2022).

A família IL-1 compreende mediadores centrais dos processos inflamatórios e é representada pelas citocinas IL-1 α e IL-1 β , sendo a última produzida por monócitos, macrófagos e células dendríticas após a ativação por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por sinalização de outras citocinas pró-inflamatórias ou até mesmo pela sua própria presença como uma forma de auto indução inflamatória (FIELDS; GÜNTHER; SUNDBERG, 2019).

Ao ativar as células do sistema imunológico inato e adaptativo durante um período inflamatório ou de infecção, as citocinas da família IL-1 ativam cascatas que levam às atividades biológicas pró-inflamatórias, como a vasodilatação, a hematopoiese, angiogênese, atração de leucócitos e sinalização para linfócitos (CHAN; SCHRODER, 2019). Os níveis elevados e prolongados da secreção de citocinas IL-1 estão relacionados com a patogênese da artrite reumatoide, doenças renais, osteoartrite e gota (BODOFSKY *et al.*, 2020; CAPOLONGO; FERRADO; UNWIN, 2022; CAVALLI *et al.*, 2021; CHAN; SCHRODER, 2019).

Buscando a redução do processo inflamatório causado por IL-1 β em condições patológicas, anticorpos vêm sendo desenvolvidos para suprimir a ação dessa citocina e impedir a sua ligação para com os seus receptores IL1-R1/ IL1-3 e, conseqüentemente, reduzem a sinalização intracelular que resultam em respostas pró-inflamatórias prolongadas que podem levar a danos teciduais (SCHENK *et al.*,

2019; BANDACH; SEGEV; LANDAU, 2021). Inibidores de alta afinidade pela IL-1 β , como o anticorpo monoclonal canakinumab, constituem um agrupamento de medicamentos importantes para a imunoregulação e desempenham um papel na redução da inflamação e nas respostas imunológicas (ORROCK; ILOWITE, 2016).

2.2 Plantas como biofábricas de proteínas heterólogas e o modelo de produção *Nicotiana benthamiana*

Com o alto custo da produção de proteínas heterólogas, as plantas se destacam por serem capazes de modificações complexas e de modificações pós-traducionais – não encontradas em sistemas procariotos de expressão, por exemplo – que aumentam a especificidade e eficiência do tratamento. A realização da maioria de modificações pós-traducionais complexas necessárias para a ação de proteínas eucarióticas, juntamente com as questões de escala, custo e segurança, faz com que as plantas sejam uma plataforma flexível e importante de bioprodução (WU *et al.*, 2021).

Por meio da utilização de plantas como biofábricas é possível obter um rendimento maior e de custo relativamente mais baixo para a produção de proteínas recombinantes terapêuticas, permitindo a produção em escalas industriais e o tratamento de uma gama de enfermidades, como cânceres, toxoplasmose e envenenamentos por serpentes (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019; PARK *et al.*, 2020; BURNETT; BURNETT, 2020; GOMES *et al.*, 2019; ZOOKKEFLI *et al.*, 2020). A produção heteróloga de proteínas biofarmacêuticas inclui vacinas, anticorpos monoclonais e proteínas imunomoduladores (DHAMA *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2021; NAZEAM; SINGAB, 2022).

Uma das principais estratégias utilizadas para a manipulação genética em plantas para a produção de proteínas recombinantes é a transformação estável, em que o transgene presente no vetor de expressão é introduzido no genoma de plantas cultivadas *in vitro* para formação de linhagens transgênicas, geralmente por metodologias que envolvem a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* ou bombardeio de micropartículas de DNA (SHANMUGARAJ; BULAON; PHOOLCHAROEN, 2020).

Outra forma de manipulação genética envolve a transformação transiente de plantas, em que a *Agrobacterium* carreadora do plasmídeo com o gene exógeno é infiltrada nas folhas com auxílio de uma seringa, levando a expressão transiente do transgene nas células de uma forma mais rápida e em maior quantidade – porém em menor escala –, além de fácil manipulação (BURNETT; BURNETT, 2019; DEBLER; HENARES; LEE, 2021; LI *et al.*, 2021). Ambas as formas de transformação por *Agrobacterium* são utilizadas para a obtenção de compostos de cunho terapêutico (ENGLAND *et al.*, 2023; GOMES *et al.*, 2019).

Os sistemas de produção de compostos recombinantes em plantas compreendem uma abordagem promissora devido à alta produção de biomassa vegetal em condições naturais (GHAG *et al.*, 2021). Nesse contexto, as espécies de fumo *N. benthamiana* e *N. tabacum* são frequentemente usadas como modelo de expressão com características de alto rendimento e de reprodutibilidade, com protocolo de transformação já padronizado e com capacidade de realizar modificações pós-traducionais complexas para a produção de anticorpos (GHAG *et al.*, 2021; HURTADO *et al.*, 2020; SWOPE *et al.*, 2022; NAYERI *et al.*, 2019).

2.3 A importância da seleção e confirmação de homocigotos como linhagens transgênicas segregadoras e estáveis

O estabelecimento de novas linhagens transgênicas é um processo complexo que possui como um dos principais pré-requisitos a transmissão regular do transgene e sua expressão em todas as gerações subsequentes, garantindo a manutenção e aprimoramento das características desejáveis ao longo do tempo (PASSRICHA *et al.*, 2016). A aleatoriedade e distorção da frequência da segregação do alelo entre as gerações pode comprometer a expressão do transgene (PASSRICHA *et al.*, 2016; KAMMAR *et al.*, 2023).

Após a transformação genética, as plantas transgênicas (T0) são hemizigotas e apresentam apenas uma cópia do gene de interesse e, durante a autofecundação podem seguir o padrão de herança mendeliano e produzir plantas homocigóticas na proporção de 1:4, que podem ser utilizadas para melhoria da cultura por meio da estabilidade e níveis de expressão do transgene (FIGURA 9) (LOPES *et al.*, 2020).

Neste trabalho, as plantas transgênicas T0 de *N. benthamiana* hemizigotas para a produção do anticorpo recombinante scFAB-anti-IL1 β foram transformadas com utilização de um inserto gênico que compunha a região proteica FAB do anticorpo canakinumab com modificações pela inserção de um *linker* de glicina/serina e uma *6xhis-tag* por Aragão (2022). A sequência peptídica do scFAB-anti-IL1 β foi baseada no trecho codante disponível em <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06168> do Canakinumab, com códons otimizados por *codon usage* para *Nicotiana* (ARAGÃO, 2022).

De forma a dar continuidade a *pipeline* (ANEXO B) do laboratório de Engenharia Genética de Plantas da UFJF e considerando que a aleatoriedade da herança do transgene em plantas T0 hemizigotas torna difícil o estudo do mesmo, objetivou-se a obtenção de linhagens puras de plantas homocigotas em T1. Este processo é altamente desejável, uma vez que as gerações subsequentes herdarão consistentemente o transgene e reduzirão as variações genéticas na descendência, simplificando o processo de obtenção de características desejáveis (PASSRICHA *et al.*, 2016).

Eventos T0 com uma única inserção do transgene (consequentemente, seguindo o padrão de herança mendeliano 3:1 em T1) são geneticamente estáveis e utilizados como alvo para seleção de linhagens homocigotas (BARROS *et al.*, 2011).

Assim, o número de cópias deve ser avaliado a partir da genotipagem das plantas, tradicionalmente feita pelo método de *Southern blotting* e, mais recentemente, pela alternativa qPCR (BARROS *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2020).

A qPCR é uma ferramenta importante para a caracterização molecular de organismos transgênicos e, ao utilizar um gene endógeno como valor de referência, é possível determinar o número de cópias em plantas da geração T1 utilizando o DNA de plantas T0 como controle para uma única cópia de inserção do transgene (BARROS *et al.*, 2011; PASSRICHA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2020; KAMMAR *et al.*, 2023). A planta será considerada homocigota por natureza quando o número de cópias for duas vezes maior que da planta parental T0 (PASSRICHA *et al.*, 2016).

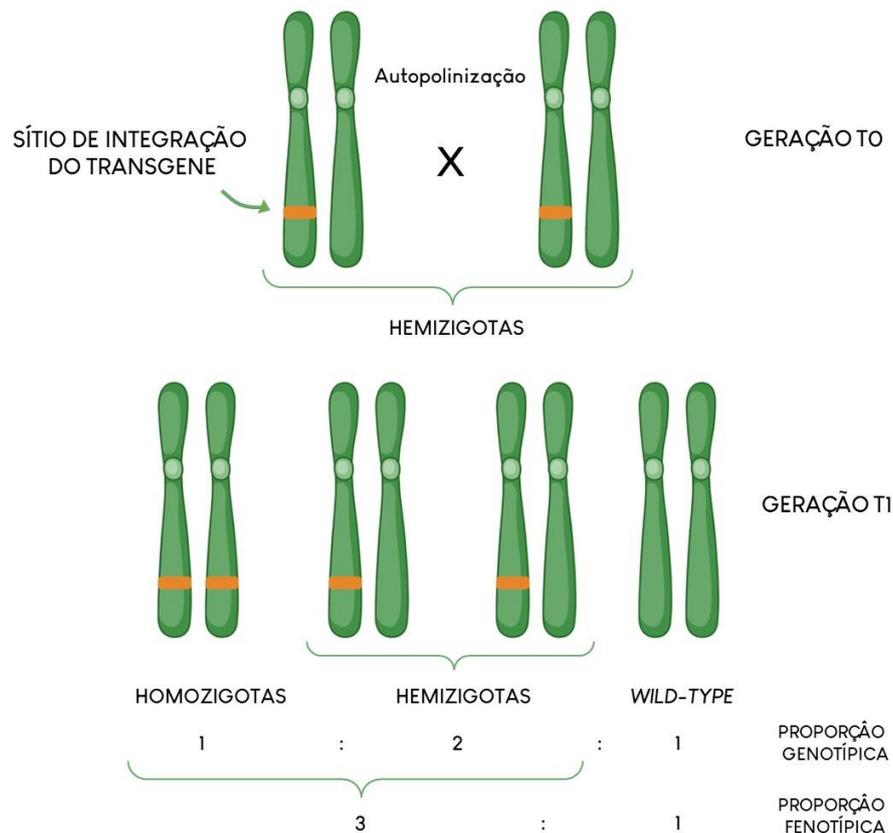


Figura 9. Esquema representativo da herança mendeliana em plantas transgênicas. Na geração parental T0, as plantas transgênicas são hemizigóticas para o gene de interesse. A segregação do transgene em T0 resulta em descendentes hemizigotos, homocigotos (apresentam duas cópias dos transgene) e *wild type* em T1. Apenas um quarto da geração é homocigota e permite a estabilidade da expressão do transgene. Fonte: Elaborado pelo autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar linhagens transgênicas homozigotas de forma a otimizar a produção do anticorpo recombinante de cadeia simples scFAB-anti-IL1 β em *Nicotiana benthamiana*.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o conteúdo de DNA em plantas *N. benthamiana* T0 para produção de scFAB-anti-IL1 β ;
- Caracterizar segregantes de plantas T1 para o gene *scFab-anti-IL1 β* entre espécimes hemizigotos e homozigotos por qPCR;
- Diferenciar a expressão do transgene *scFAB-anti-IL1 β* em plantas homozigotas e heterozigotas por análise de RNA por RT-qPCR.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo e manutenção de *Nicotiana benthamiana*

Plantas transgênicas de *N. benthamiana* hemizigotas (T0) transformadas de forma estável para sequência genética scFAB-anti-IL1 β foram utilizadas neste estudo. Os eventos transgênicos foram mantidos *in vitro* por aproximadamente 40 meses em sala de crescimento no laboratório de Engenharia Genética de Plantas (ICB-UFJF) sob regime de luz de 16 horas, irradiância de 100-125 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas brancas LED 6.500 K; Avant[®]) e temperatura de 23 ± 2 °C. Os indivíduos foram micropropagados pelos segmentos nodais a cada 3-4 semanas e mantidos em meio de cultivo contendo 4,4 g.L⁻¹ MS em pó (M5519-50L; SIGMA, USA) (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 6 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (GSK-GlaxoSmithKline[®]; (v/v); adicionado pós-autoclavagem), 0,1% de *Plant Preservative Mixture* (PPM; *Plant Cell Technology*[®]; (v/v); adicionado pré-autoclavagem) e 27 mg.L⁻¹ de sulfato de ferro (NaEDTAFe·3H₂O). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 e esterilizado por autoclavagem durante 20 minutos, na pressão de 1,1kg/cm² e na temperatura de 121 °C.

4.2 Estabilidade genética por citometria de fluxo

Diferentes linhagens de plantas de tabaco transgênicas mantidas *in vitro* por pelo menos 40 meses foram analisadas quanto à estabilidade genética por meio da avaliação do conteúdo relativo de DNA por citometria de fluxo. A quantidade de DNA foi estimada com uso do controle *Pisum sativum* 'Citrad' (2 C = 9.09 pg) para posterior comparação com o conteúdo genômico de plantas não transformadas (*wild type*). Para isso, 20-50mg de folhas das linhagens transgênicas e *wild type* foram picotadas com o auxílio de um bisturi, em uma placa de Petri de vidro contendo 300 μL de tampão WPB (LOUREIRO *et al.*, 2007). Após o isolamento dos núcleos, a suspensão obtida foi filtrada por uma rede de nylon de 30 μm e os núcleos foram corados com 25 μL de iodeto de propídio (10 mg.mL⁻¹) para a leitura em citômetro (CytoFlex, Beckman Coulter, Alemanha).

4.3 Detecção de gene repórter GFP

As plantas transgênicas de *N. benthamiana* foram transformadas com o vetor final pK7GW2D via *Agrobacterium* GV3101, que apresenta os genes repórter e de seleção de transformantes *EgfpER* e *NPTII* para seleção negativa (FIGURA 10). A presença de GFP em plantas T0 de *N. benthamiana* foi analisada a partir da cocção em chapa aquecedora de folhas dos eventos transgênicos por 1-2 minutos em EtOH absoluto, com posterior visualização em microscópio invertido de fluorescência com filtro em comprimento de onda de 395-475 nm. Como controle negativo, folhas de *N. benthamiana wild type* foram verificadas quanto à ausência de GFP.



Figura 10. Mapa esquemático do vetor pK7GW2D com o cassete de expressão do anticorpo recombinante scFAB-anti-IL1 β (ARAGÃO, 2022 adaptado).

4.4 Aclimatização de plantas T0 para produção de sementes

Os eventos transgênicos T0 de *N. benthamiana* que apresentaram maior vigor *in vitro* e bom desenvolvimento radicular foram submetidos à aclimatização em substrato agrícola *Topstrato* (Hortaliças) previamente autoclavado. Para isso, as plantas foram removidas do *in vitro*, com excesso de meio MS das raízes retirado cuidadosamente com água, para posterior transferência em substrato úmido em vasos de 250 mL. Devido à alta umidade do ambiente *in vitro*, os recipientes foram cobertos por um saco plástico que, após 4 dias e com auxílio de uma tesoura, foi gradualmente cortado para aclimatização das plantas. Após 25 dias, os sacos foram inteiramente removidos. As sementes foram coletadas ao longo de 5-6 meses e armazenadas em papel tipo *kraft* entre 2-8 °C. Para o cultivo, as sementes, obtidas por autofecundação, foram lavadas primeiramente em água estéril por 3 vezes, para subsequentemente serem expostas por 1 minuto em EtOH 70% e em NaClO 1% por 15 minutos. Após o tratamento de desinfestação, foram lavadas com água estéril por 6 vezes – com excesso removido com auxílio de papel filtro –, e inoculadas em meio de cultivo

contendo 4,4 g.L⁻¹ MS (p/v), 30 g.L⁻¹ de sacarose (p/v), 6 g.L⁻¹ de ágar (p/v), 200 mg.L⁻¹ de Timentin (v/v), 0,1% de PPM (v/v), 27mg.L⁻¹ de NaEDTAFe·3H₂O (v/v) e 100 mg.L⁻¹ de canamicina (v/v), antibiótico responsável pela seleção de plantas não transformantes (gene *NPTII*). As plântulas T1 emergentes foram transplantadas *in vitro* 6 dias após a germinação. As plantas aclimatizadas e pertencentes à geração T1 foram mantidas em sala de crescimento, sob as mesmas condições explicitadas no elemento textual '4.1'.

4.5 Extração de DNA

O DNA total de folhas foi extraído de plantas T0 e de plantas T1 cultivadas *in vitro*, utilizando a metodologia de extração com CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*). Aproximadamente 100-200mg de tecido vegetal (folhas) de *N. benthamiana* foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido. O pó fino obtido foi exposto a 800 µL de tampão CTAB a 65 °C (CTAB 2%; NaCl 5M; Tris-HCl 1M, pH 8,0; EDTA 500 mM, pH 8,0; e 0,2% β-mercaptoetanol), homogeneizado em vórtex e incubado por 30 minutos em banho seco a 65 °C, com agitações periódicas a cada 10 minutos. Após homogeneização e incubação, as amostras foram acrescidas de 500 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), seguido de centrifugação por 10 minutos a 8.000 rpm. Após a centrifugação, a fase aquosa foi recuperada e incubada com 100 µg.mL⁻¹ de RNase A Pancreática por 30 minutos a 37°C e, subsequentemente, acrescida de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) com recuperação da fase aquosa após a centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos. O DNA presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de um volume de isopropanol gelado e com a realização de 20 inversões com posterior centrifugação por 20 minutos a 10.000 rpm. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o precipitado lavado com 500 µL de etanol 70%, seguido de centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi secado por período *overnight* e posteriormente ressuspendido em 100 µL de água ultrapura. Após a quantificação e verificação de integridade de DNA em NanoDrop® ND-1000 UV/VIS, as amostras com alto grau de pureza foram congeladas em -20 °C para análises.

4.6 Análise genotípica por qPCR e Identificação de linhagens transgênicas T1

As linhagens transgênicas T1 de *N. benthamiana* foram obtidas a partir da germinação de sementes advindas de plantas T0, conforme descrito no elemento textual '4.4.' Considerando que o qPCR é capaz de determinar com precisão o número de cópias de DNA transgênico a partir da normalização do valor de Ct (*cycle threshold*) em relação ao controle endógeno o gene *18S rRNA*, plantas homozigotas e hemizigotas para scFAB-anti-IL1 β foram distinguidas por quantificação relativa por método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ com plantas T0 hemizigotas (adaptado de BARROS *et al.*, 2011). O DNA foi obtido conforme elemento '4.5' e o mix foi preparado de forma com que cada reação apresentasse 2 μ L de DNA na concentração de 50 ng. μ L⁻¹, 0,7 μ L dos conjuntos de primers (concentração final 350 nM; TABELA 6) e 10 μ L *SYBR Green I* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), completando a reação com água ultrapura para um volume de 20 μ L. Todas as reações foram executadas no QuantStudio usando o seguinte programa: 3 min 95 °C, 40 vezes (10s 95 °C; 30s 60 °C), seguido de fusão de 65 °C a 90 °C. Os dados brutos foram processados usando o termociclador *QuantStudio 3 Real-time PCR System* e as estimativas do número de cópias de T-DNA feitas usando o método $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Ct=50). A eficiência da reação foi calculada por meio de uma curva padrão obtida a partir de diluições seriadas de 1, 1:10, 1:100 e 1:1000 do DNA da amostra calibradora hemizigota.

Em que:

$$\Delta Ct = Ct_{alvo} - Ct_{referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{alvo} - \Delta Ct_{referência}$$

Tabela 6. Sequências de primers utilizados para as sequências alvo scFAB-anti-IL1 β e 18s.

Gene		Sequência
18S RNA	<i>forward</i>	GCAAGACCGAAACTCAAAGG
	<i>reverse</i>	TGTTTCATATGTCAAGGGCTGG
scFAB IL-1 β	<i>forward</i>	AGTCTGGAAGTCTTCTGTTG
	<i>reverse</i>	AGTACGTCGAGTCCTTGGAG

4.7 Extração de RNA

Para a extração de RNA total de plantas T1 de *N. benthamiana*, cerca de 100-200 mg de folhas foram submetidas à maceração em nitrogênio em microtubos com auxílio de bastão de vidro livre de nucleases (*RNAse free*) e autoclavados a 121 °C durante 20 minutos. O pó fino obtido foi exposto em 1mL do reagente TRIzol® e homogeneizado em vórtex por aproximadamente 1 minuto para maceração dos tecidos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, com sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio seguida de vigorosa agitação em vórtex por 30 s e deixados em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram novamente submetidas a centrifugação com os mesmos parâmetros descritos acima. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo com 600 µL de isopropanol. Os microtubos foram agitados manualmente por inversão por 1 minuto e submetidos à nova centrifugação (12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C), com sobrenadante descartado. As amostras foram acrescidas de 1 mL de EtOH 80% seguida de mais uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, após 10-20 minutos, os pellets foram ressuspensos em 30 µL de água milli Q. Após a quantificação e verificação de integridade de RNA em NanoDrop® ND-1000 UV/VIS, as amostras com alto grau de pureza foram congeladas em -20 °C para análises.

4.8 Síntese de cDNA por Transcriptase Reversa

As amostras foram tratadas com DNase com incubação por 1h a 37 °C. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada por transcrição reversa (RT), utilizando as fitas de mRNA e a Transcriptase Reversa (Applied Biosystems). Na reação, os reagentes dNTP, *random primers*, RT buffer e H₂O *RNAse free* foram adicionados aos microtubos, que posteriormente foram incubados a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) seguindo as orientações do fabricante. Os microtubos contendo cDNA foram armazenados a -20°C para posterior utilização.

4.9 Análise da expressão do transgene por RT-qPCR de cDNA

Microplacas de 96 poços específicas para RT-qPCR foram montadas com 20 μL de reação, com mix contendo 10 μL *SYBR Green I*; 0,4 μL de cada conjunto de primers na concentração de 10 μM (concentração final de 200 nM) (TABELA 6); 5 μL de cDNA de cada amostra; e com o volume completado com 4,2 μL de água *nuclease-free*. Após a pipetagem, a microplaca foi selada com filme plástico próprio (MicroAmp™) e submetida à amplificação em tempo real no termociclador QuantStudio 3 Real-time PCR System, com programação conforme elemento textual '4.6'.

4.10 Extração e purificação de proteínas

Para a extração proteica, folhas de *N. benthamiana* transgênicas para scFAB-anti-IL1 β foram coletadas e pulverizadas em pó fino em almofariz com nitrogênio líquido. O pó vegetal pulverizado foi exposto no volume de 3:1 em solução de extração de proteínas contendo Tris 5 mM pH 6.7, sacarose 8%, leupeptina 0,50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pepstatina 0,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, inibidor de tripsina 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e PMSF 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, homogeneizados com auxílio de pipeta e transferido para tubos de centrifugação. Os tubos foram centrifugados a 4 °C a 5.000 rpm por 30 minutos, com a fase aquosa recuperada e submetida a nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi filtrado em membranas PES 0.22 μm e, após separar alíquotas para verificar a extração de proteínas totais solúveis, o extrato proteico bruto foi purificado em coluna de afinidade por níquel HisTrap HP (Cytiva) de acordo com as instruções do fabricante. Para eluição, foi utilizado tampão acrescido de 500mM de Imidazol (GOMES *et al.*, 2019). As amostras foram coletadas em frações de 1000 μL , que foram posteriormente armazenadas em -20 °C.

4.11 Dot blotting

As amostras proteicas do extrato bruto e das frações purificadas, bem como amostras advindas da extração de folhas de plantas selvagens (controle negativo), foram diretamente aplicadas (~15 μg) em membranas de nitrocelulose Amersham Protran 0.2 μm (GE-Healthcare Life Sciences) para a realização de "Dot Blotting"

(HARLOW e LANE, 1988). Com as amostras secas, as membranas foram bloqueadas em solução de PBS pH 7.4 contendo 5% de caseína pelo período de, no mínimo, 1 hora. Após o bloqueio, as membranas foram inicialmente lavadas em uma solução contendo PBS (pH 7,4) acrescido de Tween-20 0,1%, seguido de mais duas lavagens (3 minutos cada) em solução de PBS (pH 7,4). As membranas bloqueadas e lavadas foram então submetidas a incubação com anticorpo anti-his conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich®) por duas horas na diluição de 1:2000. Após a incubação, as membranas foram lavadas com PBS (pH 7,4) e os ensaios foram revelados por quimioluminescência usando o luminol como substrato, seguido de exposição a filmes de raio-X (Amersham Hyperfilme ECL, GE-Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante (ECL Western Blotting System; GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

4.12 Eletroforese em gel de acrilamida SDS-page

Para a visualização das proteínas, as amostras de proteína total e fracionadas foram solubilizadas em tampão de amostra contendo 5% de β -mercaptoetanol e submetidas a banho-seco a 100 °C por 10 minutos e aplicadas nos poços do gel na concentração de 1 ug por poço, sendo um poço destinado aos marcadores de peso molecular pré-corados (Precision Plus Protein Standards Dual Color Bio-RAD). A corrida foi realizada em gel de poliacrilamida a 15% com 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 15%) de *resolving* gel e 4% de *stacking* gel, na amperagem de 30 mA/gel em cuba de eletroforese Mini-protean III Cell (BIORAD). Para quantificação, as frações proteicas purificadas foram submetidas ao RC/DC™ Protein Assay Kit (BIORAD). Após a corrida, as proteínas foram visualizadas por metodologias de coloração por *Coomassie Brilliant Blue* por impregnação de prata. Para coloração com *Coomassie Brilliant Blue* o gel foi fixado em uma solução de ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por 20 minutos sob agitação e, posteriormente corado por 20 minutos com solução de *Coomassie Brilliant Blue* 0,2% diluído em EtOH 90% (p/v) e misturada com um volume de solução 20% ácido acético. Para a descoloração, o gel ficou em contato *overnight* com solução de acético 10% (v/v) e etanol 40%(v/v). Já na coloração de prata, o gel foi fixado com uma solução de etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formol 0,04% (v/v) por uma hora, seguido de três lavagens com água destilada por 5 minutos cada. Após a lavagem, o gel foi colocado em contato com solução de tiosulfato de sódio (0,04%) por um minuto, seguido de uma rápida lavagem e

impregnação com solução de prata 0,1% (p/v) por 20 minutos ao abrigo de luz, sob agitação. O desenvolvimento da coloração foi feito com solução de carbonato de sódio 6% (p/v), formol 0,1% (v/v) e tiosulfato de sódio ($4 \cdot 10^{-6}$ g.L⁻¹). A reação foi parada com solução de metanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v).

4.13 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram investigados quanto à distribuição em proporção mendeliana fenotípicas por meio do teste estatístico Qui-Quadrado ao nível de significância de 5% com auxílio do software Excel. Os resultados foram organizados na forma de gráficos e tabelas. O software GraphPad Prism 8 foi utilizado para design gráfico. Para a obtenção dos histogramas e a porcentagem de células, foi utilizado o software CytExpert 2.0. As ilustrações foram geradas a partir da adaptação de vetores disponibilizados em <www.biorender.com>. Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Conteúdo de DNA e visualização da presença de GFP em eventos T0

A citometria de fluxo foi utilizada para mensurar o conteúdo de DNA de plantas de T0 de *N. benthamiana* para scFAB-anti-IL1 β cultivadas *in vitro* por aproximadamente 40 meses. A partir da exposição dos núcleos ao tampão WPB e ao intercalante iodeto de propídeo e, utilizando como controle interno *Pisum sativum* 'Citrad', 2C = 9.09 pg), foi realizada a leitura de 5000 núcleos com obtenção de histogramas (FIGURA 11C). Após análises, observou-se diferenças de conteúdo genômico para alguns eventos transgênicos. O conteúdo de DNA da planta *wild type* apresentou aproximadamente 6 pg de DNA em detrimento dos eventos IL-1 β T0P10, IL-1 β T0P13, IL-1 β T0P14, IL-1 β T0P17, IL-1 β T0P20 e IL-1 β T0P21, que apresentaram um conteúdo genômico aproximado de 7,5 pg de DNA nos eventos lidos, sendo outros eventos compostos por *debris* e fases de divisão celular (FIGURA 11B; 11C).

Entretanto, considerando que o interesse de produção biotecnológico farmacêutico e que as linhagens de conteúdo genômico estatisticamente diferentes de plantas *wild type* apresentavam condições fenotípicas vigorosas (FIGURA 11D), as linhagens transgênicas foram submetidas à análise da presença do gene repórter GFP a partir da cocção das folhas em etanol e visualização sob fluorescência. Folhas das linhagens IL-1 β T0P10, IL-1 β T0P13, IL-1 β T0P17, IL-1 β T0P20 e IL-1 β T0P21 apresentaram fluorescência verde (respectivamente, FIGURA 11F; 11G; 11H; 11I; 11J) em detrimento de plantas *wild type* (FIGURA 11E).

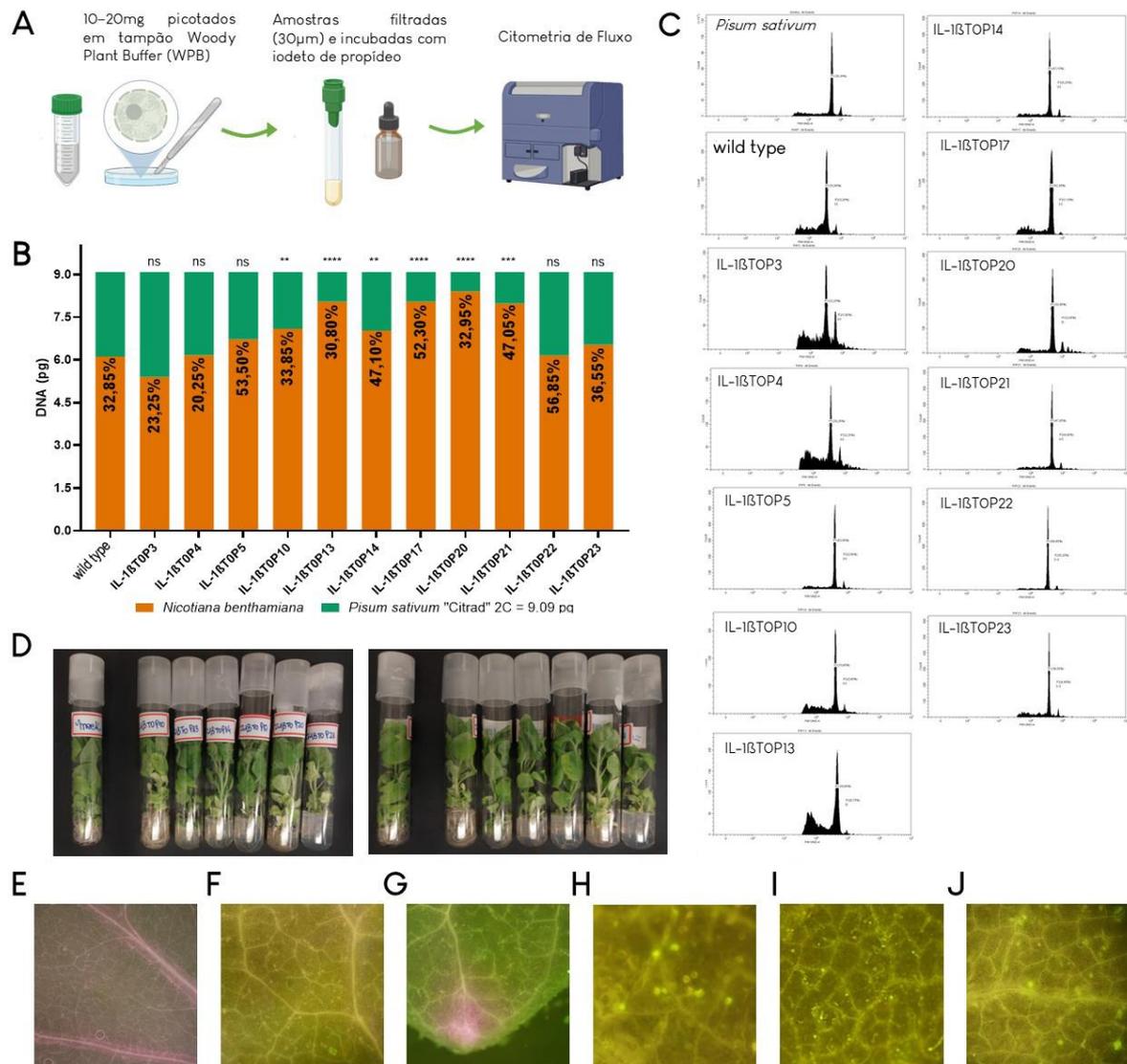


Figura 11. Ilustração da metodologia de citometria de fluxo (A). Em (B) os histogramas obtidos na citometria e em (C) os dados de citometria em análise gráfica comparando o conteúdo genômico dos eventos transgênicos com o controle *wild type*; os percentuais indicados nas barras representam os eventos lidos. Observou-se em (D) a semelhança entre o vigor fenotípico in vitro entre plantas dos eventos transgênicos e de plantas *wild type*. Foi possível validar a ausência (E) de GFP em plantas *wild type*, bem como a presença de GFP em (F), (G), (H), (I) e (J) nos eventos IL-1βTOP10, IL-1βTOP13, IL-1βTOP17, IL-1βTOP20 e IL-1βTOP21, respectivamente. EXPLICAR OS PERCENTUAIS DOS GRAIFCOS

5.2 Obtenção de plantas T1 a partir da aclimatização de plantas T0

Utilizando os fenótipos observados com enraizamento, os eventos transgênicos T0 de *N. benthamiana* foram submetidos à aclimatização para obtenção de sementes e verificação do padrão de segregação de *scFAB-anti-IL1 β* em T1. As sementes de plantas transgênicas foram avaliadas quanto à presença do inserto do transgene em placas contendo meio MS com o agente de seleção canamicina, com linhagens apresentando taxas de germinação do transgene entre 48,59% para o evento IL-1 β T0P22 e de 95,53% para o evento IL-1 β T0P20 (TABELA 7).

As razões de segregação para a germinação de sementes resistentes à canamicina de três eventos transgênicos (IL-1 β T0P14; IL-1 β T0P20; IL-1 β T0P21) se encaixam bem na relação mendeliana de 3:1, o que é esperado para a segregação de um único gene inserido com característica dominante na planta T0 hemizigota (TABELA 8; FIGURA 12C).

Os clones do evento transgênico IL-1 β T0P17 não produziram sementes (TABELA 7). Considerando o padrão de segregação observado de 3:1, o *p-value* e a boa taxa germinativa das sementes (TABELA 7; TABELA 8), juntamente com o vigor *in vitro* (FIGURA 12C), os indivíduos germinados da linhagem IL-1 β T0P20 foram recultivados *in vitro* após 6 dias (FIGURA 12C).

Tabela 7. Avaliação das respostas de germinação de sementes advindas de plantas T0 de *N. benthamiana* transgênicas para a produção de scFAB-anti-IL1 β .

Linhagens transgênicas aclimatizadas	Sementes inoculadas	Sementes germinadas resistentes	Germinadas não resistentes	Não germinadas	% germinação
IL-1 β T0P5	175	94	44	37	78,85
IL-1 β T0P8	122	79	35	8	93,44
IL-1 β T0P13	260	116	125	19	92,62
IL-1 β T0P14	226	167	46	13	94,24
IL-1 β T0P17	-	-	-	-	-
IL-1 β T0P20	269	204	53	12	95,53
IL-1 β T0P21	106	78	20	8	92,45
IL-1 β T0P22	107	44	8	55	48,59

Tabela 8. Padrão de segregação do transgene na progênie de plantas T0 de *N. benthamiana* transgênicas para scFAB-anti-IL1 β .

Eventos transgênicos	Sementes inoculadas	Sementes germinadas resistentes	Sementes suscetíveis	Segregação	$\chi^2_{\text{calc.}}$	p-valor
IL-1 β T0P5	175	94	81	-	42.28	0,000
IL-1 β T0P8	122	79	43	-	6.83	0,009
IL-1 β T0P13	260	116	144	-	128.02	0,000
IL-1 β T0P14	226	167	59	3:1	0.14	0,701
IL-1 β T0P17	-	-	-	-	-	-
IL-1 β T0P20	269	204	65	3:1	0.10	0,751
IL-1 β T0P21	106	78	28	3:1	0.11	0,737
IL-1 β T0P22	107	44	63	-	65.44	0,000

O valor padrão de χ^2 tabelado para um grau de liberdade foi igual a 3,84; o valor considerado foi de $p \leq 0,05$; Valores de χ^2 calculados (calc) $\leq 3,84$ sugerem padrão de segregação 3:1. Valores acima do p-valor indicam que o observado no padrão de segregação corresponde ao esperado, com variações ao acaso.

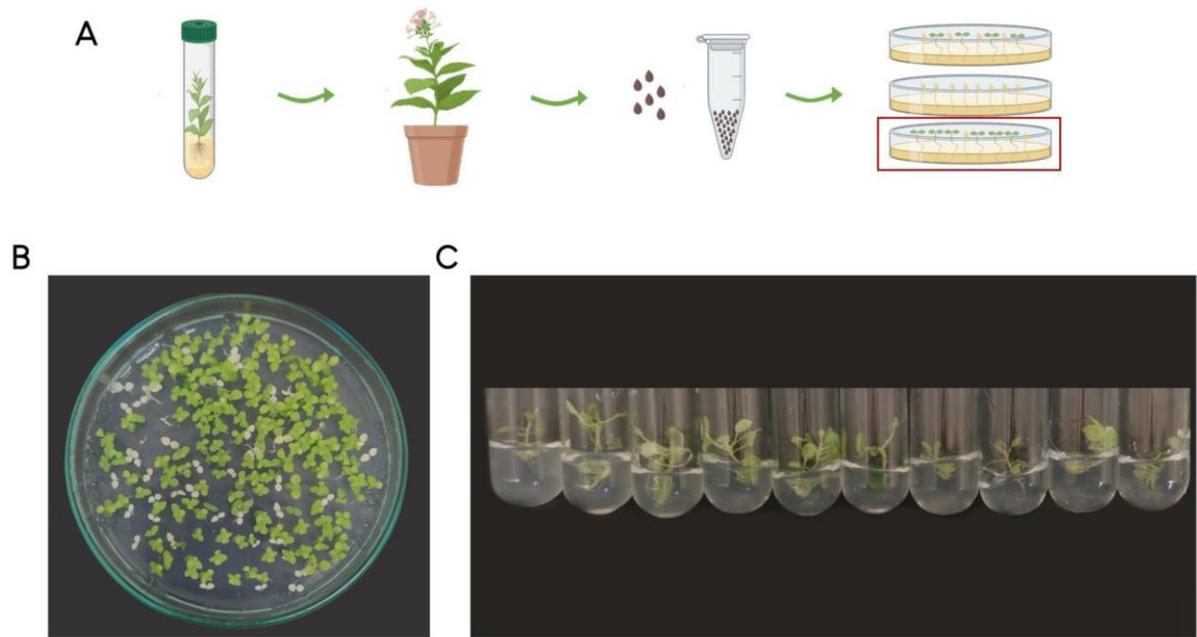


Figura 12. Esquema ilustrativo do processo de aclimatização, da coleta de sementes de indivíduos transgênicos T0 de *N. benthamiana* e da seleção de segregantes (A). Em (B), foto ilustrativa da segregação 3:1 de Indivíduos T1 oriundos da germinação de sementes T0 de *N. benthamiana* do evento transgênico IL-1 β T0P20. Em (C) os indivíduos de T1 do evento IL-1 β T0P20 transplantados para tubos *in vitro* 6 dias após a germinação.

5.3 Genotipagem de linhagens T1

O método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ é alternativamente utilizado para a quantificação relativa do número de cópias do transgene por meio de qPCR. Para obter-se uma quantificação relativa mais precisa, a eficiência de amplificação do gene endógeno *18S* deve ser semelhante à do gene *scFAB-anti-IL1 β* . Para a diferenciação de plantas T1 hemizigotas e homozigotas para o transgene, 15 indivíduos advindos do evento transgênico hemizigoto IL-1 β T0P20 foram escolhidos de forma aleatória. As eficiências de amplificação para ambos os genes foram calculadas a partir da diluição seriada do DNA extraído do evento IL-1 β T0P20, que seguia o padrão mendeliano 3:1, contendo uma única cópia do transgene (TABELA 8). O cálculo das eficiências de amplificação foi determinado com valores de $R=0,9973$ para o gene *scFAB-anti-IL1 β* (FIGURA 13A) e de $R=0,9993$ para o gene *18S* (FIGURA 13B), indicando que os valores de C_t obtidos foram apropriados para quantificação relativa. Na figura 14, o gráfico de amplificação (A) e a curva de dissociação (B) gerados com os primers *scFAB IL-1 β* e *18S*. Com a análise dos dados de C_t , identificou-se plantas heterozigotas e linhagens homozigotas para o transgene *scFAB-anti-IL1 β* (FIGURA 14C; TABELA 9).

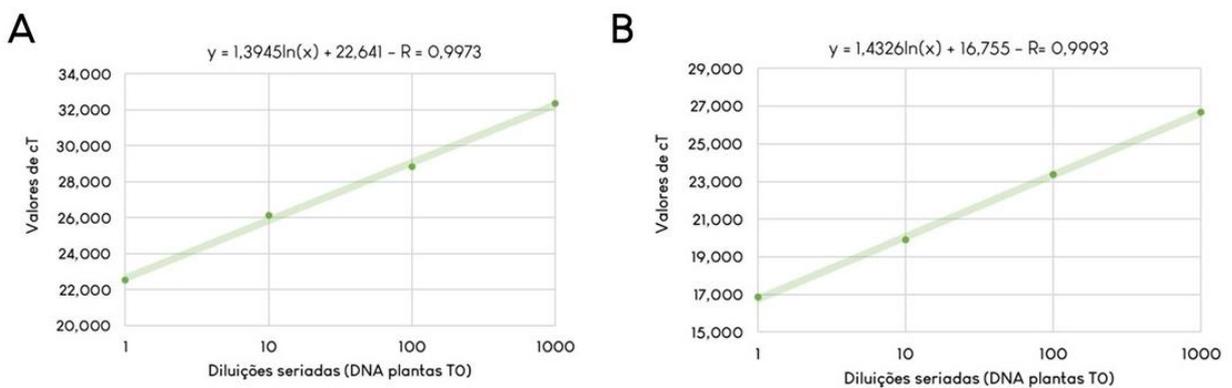


Figura 13. Eficiência de amplificação dos genes *scFAB IL-1 β* (A) e *18S* (B). O coeficiente de correlação linear (R^2) e o coeficiente de inclinação da reta estão apresentados no gráfico.

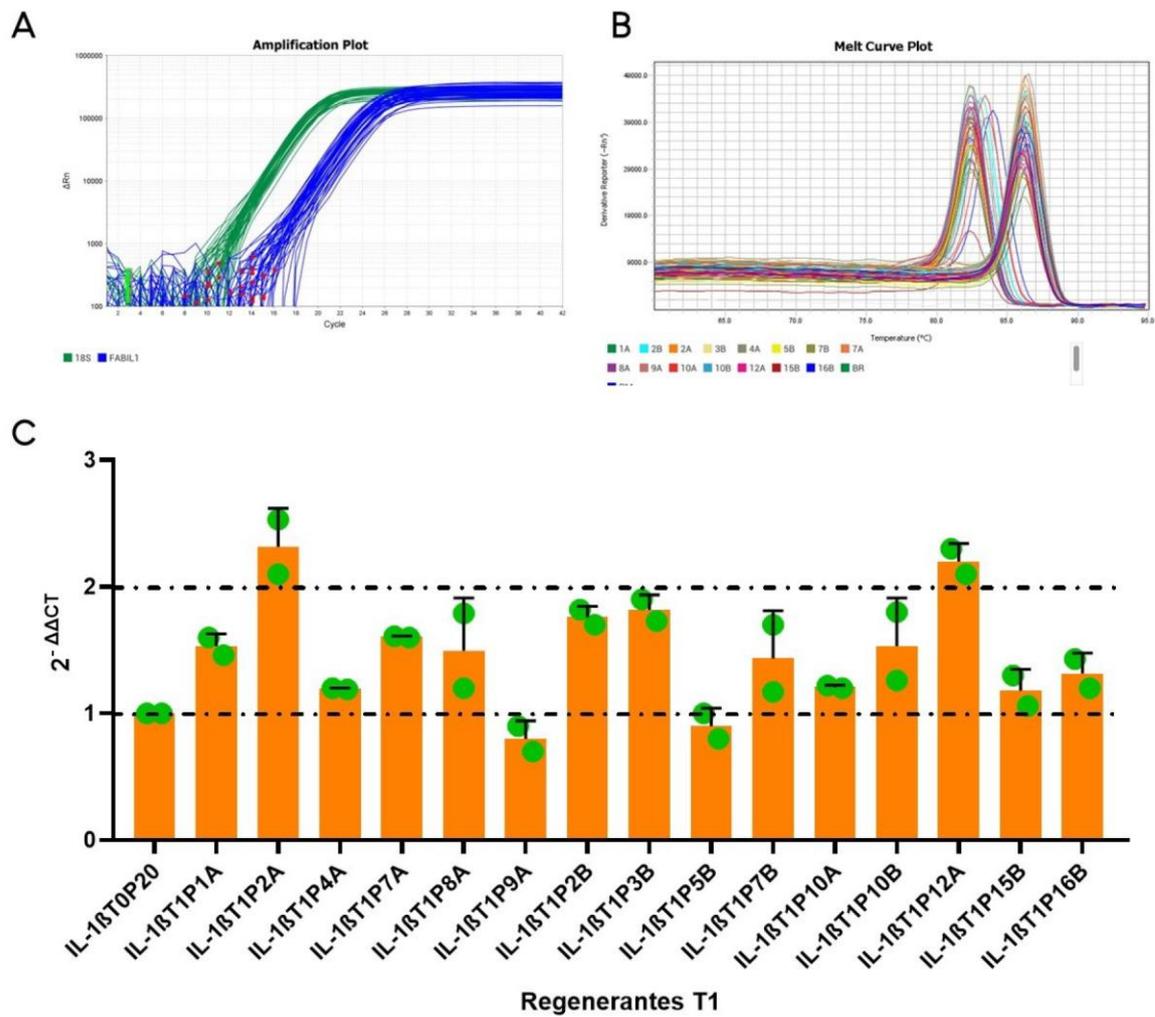


Figura 14. Em (A) a curva padrão de amplificação com uso dos primers 18s e scFAB IL-1 β e em (B) a curva de dissociação. Dados de Ct gerados por qPCR usados para cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ permitiram a identificação de indivíduos de *N. benthamiana* com um ou dois números de cópia para o transgene scFAB-anti-IL1 β (C).

Tabela 9. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos em qPCR para a relação a linhagem hemizigota T0 e a identificação de indivíduos heterozigotos e de linhagens homozigotas de *N. benthamiana* transgênica para scFAB-anti-IL1 β .

Linhagens transgênicas	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Cópias estimadas
IL-1 β T0P20	6,22 \pm 0,71	1 \pm 0,0	1
IL-1 β T1P1A	5,60 \pm 0,81	1,53 \pm 0,09	1
IL-1 β T1P2A	5,00 \pm 0,53	2,31 \pm 0,30	2
IL-1 β T1P4A	5,98 \pm 0,68	1,19 \pm 0,01	1
IL-1 β T1P7A	5,51 \pm 0,73	1,60 \pm 0,01	1
IL-1 β T1P8A	5,68 \pm 0,28	1,49 \pm 0,47	1
IL-1 β T1P9A	6,58 \pm 0,92	0,8 \pm 0,14	1
IL-1 β T1P2B	5,42 \pm 0,61	1,76 \pm 0,08	2
IL-1 β T1P3B	5,37 \pm 0,77	1,81 \pm 0,12	2
IL-1 β T1P5B	6,38 \pm 0,94	0,9 \pm 0,14	1
IL-1 β T1P7B	5,71 \pm 1,1	1,43 \pm 0,37	1
IL-1 β T1P10A	5,91 \pm 0,73	1,21 \pm 0,01	1
IL-1 β T1P10B	5,64 \pm 1,04	1,53 \pm 0,38	1
IL-1 β T1P12A	5,09 \pm 0,78	2,2 \pm 0,14	2
IL-1 β T1P15B	6,01 \pm 0,88	1,18 \pm 0,16	1
IL-1 β T1P16B	5,81 \pm 0,54	1,315 \pm 0,16	1

5.4 Extração e purificação de proteínas, eletroforese SDS-page e *dot-blotting*

Proteínas solúveis totais extraídas de folhas de plantas T1 advindas do evento IL-1 β T0P20 foram aplicadas (~1 μ g) em SDS-page 15% juntamente com concentrações variadas de soro de albumina bovina (BSA), e, após coloração por *Coomassie Brilliant Blue*, revelou a presença da banda esperada na altura de ~50kDa, possivelmente representando o anticorpo scFAB-anti-IL1 β (FIGURA 15B). Com a purificação da solução de proteínas totais, as frações foram submetidas às quantificações proteicas, revelando, por RC/DC™ Protein Assay Kit (BIORAD), a concentração de 0,94 μ g. μ L⁻¹ para a fração GF1 e de 0,72 μ g. μ L⁻¹ para a fração GF2, com rendimento aproximado de 474 μ g de anticorpo recombinante por grama de folha fresca.

Os géis de eletroforeses realizadas com as frações foram submetidos à coloração por *Coomassie Brilliant Blue* (FIGURA 15C), com as proteínas sendo melhores visualizadas na coloração por prata (FIGURA 15D). Após a purificação, observou-se apenas bandas de altura esperada para o anticorpo scFAB-anti-IL1 β . O anticorpo recombinante conta com uma *his-tag* 6x para facilitar processos de purificação e identificação da molécula. O *dot blotting* foi realizado com anti-his conjugado a peroxidase para a detecção e revelou a presença de scFAB-anti-IL1 β no extrato bruto proteico, bem como em todas as frações - exceto a de controle negativo -, com a fração GF3 apresentado menor reatividade (FIGURA 15E).

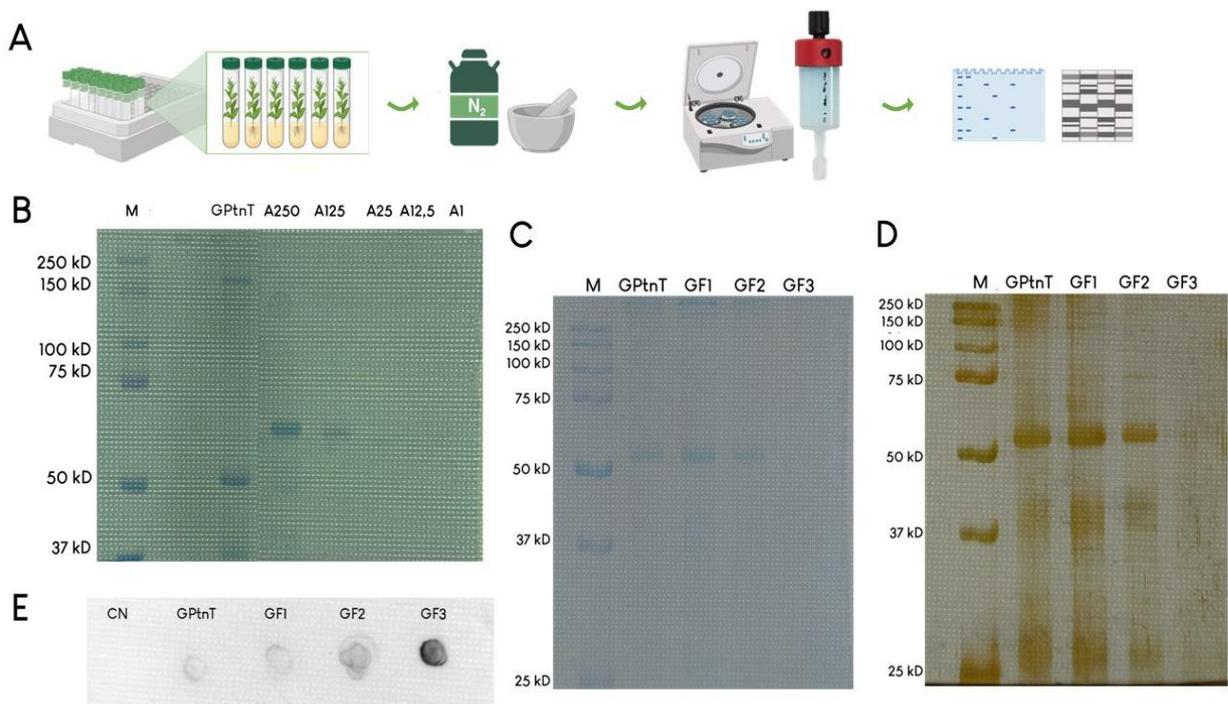


Figura 15. Ilustração esquemática do processo de extração proteica de *N. benthamiana*. Em (B) a eletroforese do extrato bruto das folhas de plantas T1 com Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*. Em (C) e em (D), a representação do SDS-page 15% das frações GF1, GF2 e GF3, com coloração por *Coomassie Brilliant Blue* e por prata, respectivamente. Em (E) a confirmação da produção do anticorpo recombinante por *dot blotting* (E). Em que, M: marcador de massa molecular; GPtnT: Proteína total de plantas germinadas; A250= BSA 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A125= BSA 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A25= BSA 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; A1= BSA 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; GF1-F3: Germinadas frações 1-3; CN: Extrato bruto proteico de plantas *wild type*.

5.5 Extração de RNA e análise de expressão de scFAB-anti-IL1 β em plantas T1 de *N. benthamiana*

A fim de verificar a expressão de scFAB-anti-IL1 β em indivíduos T1, foram realizadas análises de RT-qPCR. Com os dados obtidos para a análise da expressão do transgene em indivíduos hemizigotos e homozigotos segregantes em T1, considerando como padrão calibrador a expressão da planta-mãe hemizigota T0 IL-1 β T0P20, observou-se uma menor taxa de expressão de indivíduos T1 em relação a amostra calibradora T0, com exceção da linhagem IL-1 β T1P5B, que apresentou uma taxa de expressão de RNA 2,75x maior (TABELA 10).

Tabela 10. Valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ obtidos em RT-qPCR da expressão do transgene scFAB-anti-IL1 β de segregantes T1 em relação a planta mãe hemizigota T0.

Linhagens transgênicas	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
IL-1 β T0P20	5,05 \pm 0,15	1 \pm 0,00
IL-1 β T1P2A	6,15 \pm 0,53	0,5 \pm 0,14
IL-1 β T1P2B	6,95 \pm 0,50	0,25 \pm 0,07
IL-1 β T1P3B	5,11 \pm 0,26	0,95 \pm 0,07
IL-1 β T1P4A	6,48 \pm 0,34	0,35 \pm 0,07
IL-1 β T1P5B	3,61 \pm 0,42	2,75 \pm 0,49
IL-1 β T1P8A	6,18 \pm 0,21	0,45 \pm 0,07
IL-1 β T1P9A	6,315 \pm 0,16	0,4 \pm 0

6 DISCUSSÃO

Plantas T0 de *N. benthamiana* transformadas de forma estável por Aragão (2022) com o inserto gênico para produção do anticorpo scFAB-anti-IL1 β sob o promotor constitutivo CaMV35s foram mantidas *in vitro* por aproximadamente 40 meses. Para a obtenção de plantas homozigotas logo na primeira progênie T1, plantas T0 devem apresentar a característica de uma única inserção do transgene, com padrão de segregação mendeliano (3:1). Plantas T0, foram, primeiramente, submetidas à análise de conteúdo de DNA para verificar a estabilidade genômica e à visualização e detecção do gene repórter GFP.

Com a verificação do conteúdo genômico, algumas plantas apresentaram variações nos eventos lidos (FIGURA 11B). Por mais que as condições de cultivo *in vitro* sejam ideais para a propagação e multiplicação de plantas, ainda podem ocorrer alterações imprevisíveis e/ou deletérias, e, dessa forma, a utilização de práticas rigorosas de controle e manipulação, como a regulação dos ciclos de propagação e a identificação prévia dos indivíduos, podem auxiliar na redução desses riscos e melhorar o sucesso *in vitro* do transgênico (AZIZI *et al.*, 2020; FRITSCHE *et al.*, 2022).

O cultivo *in vitro* pode expor as células e os tecidos a estresses que podem ocasionar diferentes padrões de metilação ou então instabilidades genéticas nos regenerantes e, assim, os eventos transgênicos obtidos nem sempre são genotipicamente e/ou fenotipicamente iguais às plantas *wild type* (SANCHEZ-MUÑOZ *et al.*, 2019; GHOSH; IGAMBERDIEV; DEBNATH, 2021).

Após a transformação das plantas por *Agrobacterium*, as plantas regeneradas obtidas são chamadas de eventos transgênicos independentes e são hemizigotas para o gene de interesse, sendo nomeadas como plantas T0, e, para manter a consistência do fenótipo ao longo das durações, é necessário a obtenção de linhagens transgênicas homozigotas estáveis para esses eventos transgênicos (KAMMAR *et al.*, 2023).

Assim, para obter linhagens homozigotas, utilizamos os eventos transgênicos com fenótipos com bom enraizamento para a aclimatização. Observamos que o evento IL-1 β T0P17 não produziu sementes (TABELA 7). Como a integração do transgene ocorre de forma aleatória, alguns fenótipos podem ser afetados devido à integração do transgene próxima a um gene endógeno (CAIN-HOM *et al.*, 2017).

Ademais, o quimerismo pode ter sido uma das razões para a herança instável do transgene nos outros eventos transgênicos IL-1 β T0P5, IL-1 β T0P8, IL-1 β T0P13 e IL-1 β T0P22 (TABELA 8). Em outros trabalhos, alguns eventos transgênicos de grão de bico também não demonstraram estabilidade na transmissão do transgene, em que os autores relatam que a prevalência do quimerismo pode estar relacionada com a indução multicelular da organogênese de brotos, em que as células transformadas permitem o desenvolvimento de células não transformadas circundantes (BHOWMIK *et al.*, 2019).

Nos outros casos, os eventos transgênicos L-1 β T0P14, L-1 β T0P20 e L-1 β T0P21 demonstraram, pela segregação em T1, um comportamento dominante de uma única inserção do transgene com o padrão de herança seguindo o padrão mendeliano de 3:1 com $0,701 \leq p\text{-valor} \leq 0,751$ e valores de $\chi^2 \leq 3.841$ (TABELA 8). Devido ao percentual de germinação de 95,53%, a uma produção de sementes relativamente alta e ao padrão de segregação 3:1, a progênie de IL-1 β T0P20 foi recuperada dos meios contendo o agente de seleção canamicina e transplantadas em tubos individuais para análises de qPCR e de validação da produção do anticorpo scFAB-anti-IL1 β .

Linhagens homozigotas transgênicas são um pré-requisito desejável para a avaliação de características de interesse e com o uso de qPCR padronizado em curvas de alta resolução permite, com pouca laboriosidade, o acesso ao número de cópias para o determinado gene na amostra (XU *et al.*, 2022; LOPES *et al.*, 2020; KAMMAR *et al.*, 2023). A quantificação relativa por meio da comparação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vem sendo alternativamente utilizada para determinar o número de cópias de transgenes em diversas espécies, sendo capaz de acurar os segregantes hemizigotos e homozigotos em uma população de plantas T1 (XU *et al.*, 2022; NARANCIO *et al.*, 2021; BARROS *et al.*, 2011; PASSRICHA *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2020; KAMMAR *et al.*, 2023).

As linhagens T1 aleatoriamente escolhidas, apresentaram o padrão 2:1 de plantas hemizigotas:homozigotas, conforme o esperado (FIGURA 14; TABELA 9). Com a obtenção de linhagens heterozigotas e homozigotas em T1 – considerando o padrão de segregação 3:1 em T0 –, os indivíduos foram submetidos a subcultivos para extração proteica das folhas, uma vez confirmado que todos os indivíduos eram resistentes a canamicina e que estariam carregando uma ou duas cópias de scFAB-anti-IL1 β .

Após as extrações e purificações proteicas, as proteínas foram visualizadas em eletroforese SDS-page 15% em altura compatível a massa esperada de scFAB-anti-IL1 β de 50kD (FIGURA 15; ARAGÃO, 2022). As quantificações realizadas nas frações 1 e 2 (GF1 e GF2) podem ser comparadas às análises densitométricas entre as bandas de proteína total e de BSA, que, apesar de não acuradas, apontam uma concentração proteica abaixo de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 15). O rendimento obtido aproximado foi de 474 μg de anticorpo para cada grama de folha fresca, que, apesar de ser elevado em relação aos rendimentos comumente encontrados na literatura (JIANG *et al.*, 2019), é semelhante ao de Gomes e colaboradores (2019), que utilizaram o mesmo *backbone* do cassete de expressão.

Confirmando a produção de scFab-anti-IL1 β por *dot blotting* das frações purificadas (de massa \sim 50kD), também verificamos a expressão do transgene de plantas T1, hipotetizando diferenças entre indivíduos homozigotos e hemizigotos. Com o RT-qPCR do cDNA analisamos uma tendência para uma menor expressão em indivíduos T1 – exceto IL-1 β T1P5B –, sugerindo um silenciamento na progênie, que pode estar relacionado com a metilação de DNA (TABELA 10) (MA *et al.*, 2020).

Ademais, plantas transgênicas apresentam alta sensibilidade para silenciamento de transgenes em detrimento de genes endógenos, com evidências de que essa sensibilidade seja devido ao silenciamento transcricional e pós-transcricional, visto a ausência de íntros e regiões não traduzidas (UTR's) 5' e 3', regiões conhecidas pela supressão de silenciamento por RNAs (DUBROVINA; KISELEV, 2019).

7 CONCLUSÃO

Os eventos transgênicos aqui obtidos nem sempre foram genotipicamente ou fenotipicamente iguais às plantas *wild type*, devido ao tempo de manutenção *in vitro* ou pelo local de integração do transgene. Plantas com vigor fenotípico *in vitro* foram utilizadas para a obtenção de sementes T1, com três eventos transgênicos apresentando o padrão mendeliano de herança 3:1 com $0,701 \leq p\text{-valor} \leq 0,751$ e valores de $\chi^2 \leq 3.841$. Nas plantas regenerantes de T1, observou-se o padrão 2:1 de plantas hemizigotas:homozigotas, com plantas homozigotas tendenciando ao silenciamento gênico. As proteínas obtidas foram purificadas, visualizadas na altura de banda esperada de ~50 kD. quantificadas e confirmadas por *dot blotting*, com o rendimento aproximando de 474 μg do anticorpo scFab-anti-IL1 β para cada grama de folha fresca.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com os resultados aqui obtidos, é necessário a verificação da expressão de RNAs relacionados com o silenciamento gênico, como os da família Argonata, buscando respostas para iniciar o bloqueio do sistema de silenciamento. Ademais, o vetor poderá ser montado com elementos regulatórios para evitar o silenciamento gênico. Também se faz necessário avaliar se coleta de sementes é uma etapa que deve ser feita constantemente para manter o fenótipo de plantas em detrimento da manutenção prolongada em sistemas de cultura, de forma a reduzir possíveis metilações de DNA. Além disso, devem ser realizados estudos da atividade biológica do anticorpo produzido scFab-anti-IL1 β , com verificação por ELISA e testes em amostras biológicas.

9 REFERÊNCIAS

ARAGÃO, M. M. Modelagem e Expressão do Anticorpo Sintético anti-IL1 em *Nicotiana benthamiana* geneticamente modificada. **Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Ciências Biológicas com concentração em Genética e Biotecnologia)**. 79p. 2022.

AZIZI, P. *et al.* Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops. **Functional Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 508-523, 2020.

BANDACH, I.; SEGEV, Y.; LANDAU, D. Experimental modulation of Interleukin 1 shows its key role in chronic kidney disease progression and anemia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

BARROS, B. A. *et al.* Estimativa do número de inserções de transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR). **Embrapa Milho e Sorgo: Circular técnica**, 164. 6 p., 2011.

BERINI, F.; MARINELLI, F.; BINDA, E. Streptomyces: attractive hosts for recombinant protein production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1958, 2020.

BHOWMIK, S. S. D. *et al.* Robust genetic transformation system to obtain non-chimeric transgenic chickpea. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 524, 2019.

BODOFSKY, S. *et al.* Advances in our understanding of gout as an auto-inflammatory disease. In: **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. WB Saunders, 2020. p. 1089-1100.

BURNETT, M. J. B.; BURNETT, A. C. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. **Plants, People, Planet**, v. 2, n. 2, p. 121-132, 2020.

BUYEL, J. F. Plant molecular farming—integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1893, 2019.

CAI, D. *et al.* Engineering Bacillus for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 6, p. 1632-1642, 2019.

CAIN-HOM, C. *et al.* Efficient mapping of transgene integration sites and local structural changes in Cre transgenic mice using targeted locus amplification. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 8, p. e62-e62, 2017.

CAPOLONGO, G.; FERRARO, M.; UNWIN, R. Inflammation and kidney stones: cause and effect?. **Current Opinion in Urology**, p. 10.1097, 2022.

- CAVALLI, G. *et al.* Interleukin 1 α : a comprehensive review on the role of IL-1 α in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 20, n. 3, p. 102763, 2021.
- CHAN, A. H.; SCHRODER, K. Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, p. e20190314, 2019.
- CHEN, Q. Development of plant-made monoclonal antibodies against viral infections. **Current opinion in virology**, v. 52, p. 148-160, 2022.
- CHEN, X.; LI, C.; LIU, H. Enhanced recombinant protein production under special environmental stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 630814, 2021.
- COSTA, L. D. *et al.* Elaboration of a reliable strategy based on real-time PCR to characterize genetically modified plantlets and to evaluate the efficiency of a marker gene removal in grape (*Vitis* spp.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2668-2677, 2009.
- DEBLER, J. W.; HENARES, B. M.; LEE, R. C. Agroinfiltration for transient gene expression and characterization of fungal pathogen effectors in cool-season grain legume hosts. **Plant Cell Reports**, 40: 805-818, 2021
- DHAMA, K. *et al.* Plant-based vaccines and antibodies to combat COVID-19: current status and prospects. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 12, p. 2913-2920, 2020.
- DUBROVINA, A. S.; KISELEV, K. V. Exogenous RNAs for gene regulation and plant resistance. **International journal of molecular sciences**, 20.9: 2282, 2019.
- ENGLAND, C. *et al.* Plants as Biofactories for Therapeutic Proteins and Antiviral Compounds to Combat COVID-19. **Life**. 13.3: 617, 2023.
- FIELDS, J. K.; GÜNTHER, S.; SUNDBERG, E. J. Structural basis of IL-1 family cytokine signaling. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1412, 2019.
- FRITSCHÉ, Y. *et al.* *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) *in vitro* regeneration: Main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. **South African Journal of Botany**, v. 149, p. 96-108, 2022.
- GHAG, S. B. *et al.* Plant platforms for efficient heterologous protein production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 26, n. 4, p. 546-567, 2021.
- GHOSH, A.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: A review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 823-841, 2021.
- GOMES, M. *et al.* Expression of an scFv antibody fragment in *Nicotiana benthamiana* and *in vitro* assessment of its neutralizing potential against the snake

- venom metalloproteinase BaP1 from *Bothrops asper*. **Toxicon**, [S. l.], v. 160, p. 38–46, 2019.
- HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, ISBN 0-87969-314-2: pp 726. 1988.
- HAUSMANN, J. S. Targeting cytokines to treat autoinflammatory diseases. **Clinical Immunology**, v. 206, p. 23-32, 2019.
- HUANG, H. *et al.* Association between inflammation and function of cell adhesion molecules influence on gastrointestinal cancer development. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 67, 2021.
- HURTADO, J. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of anti-chikungunya virus monoclonal antibodies produced in wild-type and glycoengineered *Nicotiana benthamiana* plants. **Plant biotechnology journal**, 2020, 18.1: 266-273.
- IZNARDO, H.; PUIG, L. IL-1 Family Cytokines in Inflammatory Dermatoses: Pathogenetic Role and Potential Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 16, p. 9479, 2022.
- JIANG, M. *et al.* Production of human IFN γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 509, 2019.
- KAMMAR, S. S. *et al.* Assessment of homozygosity in transgenic plants using selectable markers. **STAR protocols**, v. 4, n. 1, p. 102031, 2023.
- KHAN, T. *et al.* Plant Biotechnology; an Important Avenue for Medicine during Pandemics: Plant Biotechnology in times of Pandemics. **Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences**, v. 58, n. S, p. 19-30, 2021.
- KOPERTEKH, L. *et al.* Transient plant production of *Salmonella Typhimurium* diagnostic antibodies. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00314, 2019.
- KORPYS-WOŹNIAK, P. *et al.* Impact of overproduced heterologous protein characteristics on physiological response in *Yarrowia lipolytica* steady-state-maintained continuous cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 9785-9800, 2020.
- LI, Y. *et al.* Effects of plant growth regulators on transient expression of foreign gene in *Nicotiana benthamiana* L. leaves. **Bioresources and Bioprocessing**, 8: 1-8, 2021
- LOPES, S. S. *et al.* Auxin independent1 (Axi1) as an endogenous gene for copy number determination in transgenic tobacco. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, 2020.

- LOUREIRO, J. *et al.* Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. **Annals of Botany**, n. 1995, p. 875–888, 2007.
- MA, M. *et al.* DNA methylation silences exogenous gene expression in transgenic birch progeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 523748, 2020.
- MIRZAEI, M. *et al.* Long-Lasting Stable Expression of Human LL-37 Antimicrobial Peptide in Transgenic Barley Plants. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 898, 2021.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Plant Physiology**, 15, 473-497, 1962.
- NARANCIO, R. *et al.* Digital PCR (dPCR) and qPCR mediated determination of transgene copy number in the forage legume white clover (*Trifolium repens*). **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 3069-3077, 2021.
- NAYERI, F. D. *et al.* Transient expression of etanercept therapeutic protein in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **International journal of biological macromolecules**, 2019, 130: 483-490.
- NAZEAM, J. A.; SINGAB, A. N. B. Immunostimulant plant proteins: Potential candidates as vaccine adjuvants. **Phytotherapy Research**, 2022.
- OHNOUTKOVÁ, L.; VLČKO, T. Homozygous transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants by anther culture. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 918, 2020.
- ORROCK, J. E.; ILOWITE, N. T. Canakinumab for the treatment of active systemic juvenile idiopathic arthritis. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 9, n. 8, p. 1015-1024, 2016.
- PARK, S. R. *et al.* Expression and in vitro function of anti-breast cancer llama-based single domain antibody VHH expressed in tobacco plants. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1354, 2020.
- PASSRICHA, N. *et al.* Assessing zygoty in progeny of transgenic plants: current methods and perspectives. **Journal of Biological Methods**, v. 3, n. 3, 2016.
- POSNER, J. *et al.* Monoclonal antibodies: past, present and future. **Concepts and Principles of Pharmacology: 100 Years of the Handbook of Experimental Pharmacology**, p. 81-141, 2019.
- SANCHEZ-MUÑOZ, R. *et al.* Genomic methylation in plant cell cultures: A barrier to the development of commercial long-term biofactories. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 12, p. 872-879, 2019.
- SATHEESHKUMAR, P. K. Expression of single chain variable fragment (scFv) molecules in plants: A comprehensive update. **Molecular biotechnology**, v. 62, n. 3, p. 151-167, 2020.

- SCHENK, K. M. *et al.* A review of canakinumab and its therapeutic potential for non-small cell lung cancer. **Anti-cancer drugs**, v. 30, n. 9, p. 879-885, 2019.
- SEHESTED, T. S. G. *et al.* Cost-effectiveness of canakinumab for prevention of recurrent cardiovascular events. **JAMA cardiology**, v. 4, n. 2, p. 128-135, 2019.
- SHANMUGARAJ, B.; I. BULAON, C. J.; PHOOLCHAROEN, W. Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. **Plants**, 2020, 9.7: 842.
- SWOPE, K. *et al.* Reproducibility and flexibility of monoclonal antibody production with *Nicotiana benthamiana*. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2022. p. 2013594.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 420, 2019.
- WU, T. *et al.* Plant cell cultures as heterologous bio-factories for secondary metabolite production. **Plant communications**, v. 2, n. 5, p. 100235, 2021.
- XU, Y. *et al.* Copy number assessment of SMN1 based on real-time PCR with high-resolution melting: fast and highly reliable testing. **Brain and Development**, v. 44, n. 7, p. 462-468, 2022.
- ZHENG, Z. *et al.* Interleukin-1 blockade treatment decreasing cardiovascular risk. **Clinical Cardiology**, v. 42, n. 10, p. 942, 2019.
- ZOOLKEFLI, F. I. R. M. *et al.* *Nicotiana Tabacum* AS A POTENTIAL PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT ANTI-*Toxoplasma* SINGLE-CHAIN FRAGMENT (scFv) ANTIBODY. **Malaysian Journal of Science**, p. 1-26, 2020.

ANEXO A – Número de amostras por tratamento de indução de embriogênese somática (ES) e organogênese de brotos em gemas axilares de capim-elefante cv. BRS Capiaçú

Tratamentos		<i>N amostral</i>			
		14 dias		28 dias	
		Nº de placas/tubos	Nº total de explantes	Nº de placas	Nº total de explantes
ES	D0B0T0	9	54	8	52
	D2B0.1	9	54	8	48
	D2B0.5	9	45	7	42
	D4B0.1	8	48	8	40
Organogênese de brotos	D0B0T0	9	54	8	48
	D0.5B2T0	8	54	7	49
	D0.1B2T0	8	40	8	40
	D0.5B0T2	9	45	8	40
	D0.1B0T2	7	56	8	48
Regeneração de brotos múltiplos	D0B0T0	17	17	-	-
	D0.5B2T0	5	5	-	-
	D0.1B2T0	25	25	-	-
	D0.5B0T2	5	5	-	-
	D0.1B0T2	14	14	-	-

ANEXO B – PIPELINE para produção de anticorpos recombinantes

