

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

AMANDA GUIMARÃES MORAES CAMARGO

**MONTAGEM *IN SILICO* DE MAPAS GENÉTICOS DE VETORES DE  
CLONAGEM DESENVOLVIDOS PARA USO EM GRAMÍNEAS**

Lorena  
2022



AMANDA GUIMARÃES MORAES CAMARGO

**Montagem *in silico* de mapas genéticos de vetores de clonagem desenvolvidos para  
uso em gramíneas**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como parte de obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia, Genômica de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Elisson Antonio da Costa Romanel

Versão Simplificada

Lorena  
2022

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Camargo, Amanda Guimarães Moraes  
Montagem *in silico* de mapas genéticos de vetores de clonagem desenvolvidos para uso em gramíneas / Amanda Guimarães Moraes Camargo; orientador Elisson Antonio da Costa Romanel - Versão Original. - Lorena, 2022.  
78 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2022

1. Cana-de-açúcar. 2. Vetores gateway. 3. Transformação genética de plantas. I. Título. II. Romanel, Elisson Antonio da Costa , orient.

## RESUMO

CAMARGO, A. G. M. **Montagem *in silico* de mapas genéticos de vetores de clonagem desenvolvidos para uso em gramíneas.** 2022. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

A cana-de-açúcar é uma cultura muito importante para a economia do Brasil, sendo o maior produtor desta cultura no mundo. A cana, gramínea monocotiledônea C4, é um híbrido interespecífico altamente poliplóide e aneuplóide e representa a cultura mais complexa geneticamente estudada até o momento. Os vetores *Gateway* são uma ferramenta biotecnológica alternativa que agiliza o processo de clonagem em relação aos vetores tradicionais que fazem uso de enzimas de restrição. Desde o início do século, diversos modelos de vetores de clonagem *Gateway* com distintas finalidades funcionais vem sendo desenvolvidos e aprimorados para uso em eudicotiledôneas. Em paralelo, vários modelos de vetores de clonagem vêm sendo desenvolvidos para uso em gramíneas, tais como, para superexpressão e silenciamento gênico por RNAi. No entanto, verifica-se pouca diversidade de vetores de clonagem para gramíneas, incluindo cana-de-açúcar e associado a isto, existe uma dificuldade de acesso e importação dos mais variados vetores de clonagem, seguindo rigorosamente as etapas legislativas e formas de pagamento internacional. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a caracterização de vetores de clonagem de gramíneas visando diferentes aplicações científicas e biotecnológicas, tanto vetores de expressão derivados do sistema *Gateway* quanto vetores FoMV (*Foxtail Mosaic Virus*). Para isso, este trabalho conduziu o sequenciamento de vetores de destino para super-expressão e silenciamento gênico por RNAi; desenvolveu variedades de vetores aptos para o estudo de promotores e genes de interesse com uso de genes repórteres e isolamento de proteínas alvo; construiu vetores contendo distintos genes de fluorescência; construiu vetores de silenciamento gênico induzido por vírus e seus respectivos mapas genéticos, seguido das análises *in silico* para enzimas de restrição. Neste trabalho, foi utilizado a reação BP Gateway para clonar o gene de interesse mGFP5, inserido em um vetor pUC57, no vetor pDONR para posterior transformação de células eletrocompetentes Top10. Espera-se que este vetor construído contribua para trabalhos de estudos de expressão e produção de proteínas para diversos fins científicos e biotecnológicos.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Vetores *Gateway*. Transformação Genética de plantas.

## ABSTRACT

CAMARGO, A. G. M. *In silico* assembly of cloning genetic maps developed for use in grass vectors. 2022. 78 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Sugarcane is a very important crop for Brazil's economy, being the largest producer of this crop in the world. Sugarcane, C4 monocotyledonous grass, is a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid and represents the most genetically complex crop studied to date. Gateway vectors are alternative biotechnological tool that streamlines the cloning process compared to traditional vectors that make use of restriction enzymes. Since the beginning of the century, several models of Gateway cloning vectors with different functional purposes have been developed and improved for use in eudicots. In parallel, several models of cloning vectors have been developed for use in grasses, such as for overexpression and gene silencing by RNAi. However, there is little diversity of cloning vectors for grasses, including sugarcane and associated with this, there is a difficulty in accessing and importing the most varied cloning vectors, strictly following the legislative steps and forms of international payment. Thus, the objective of this work was the characterization of grass cloning vectors aiming at different scientific and biotechnological applications, both expression vectors derived from the Gateway system and FoMV (Foxtail Mosaic Virus) vectors. For this, this work conducted the sequencing of target vectors for over-expression and gene silencing by RNAi; developed varieties of vectors suitable for the study of promoters and genes of interest with the use of reporter genes and isolation of target proteins; constructed vectors containing distinct fluorescence genes; constructed virus-induced gene silencing vectors and their respective genetic maps, followed by in silico analysis for restriction enzymes. In this work, the BP Gateway reaction was used to clone the gene of interest mGFP5, inserted in a pUC57 vector, into the pDONR vector for subsequent transformation of Top10 electrocompetent cells. It is expected that this constructed vector will contribute to studies of expression and production of proteins for various scientific and biotechnological purposes.

Keywords: Sugarcane. *Gateway Vectors*. Genetic Transformation of Plants.