

**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO  
DO PROMOTOR DE UM GENE QUE CODIFICA  
UMA AQUAPORINA COM EXPRESSÃO ESPECÍFICA  
EM RAIZ DE EUCALIPTO (*Eucalyptus grandis*)**

**Marcela Iara Rodrigues  
Orientador: Prof. Dr. Ivan  
de G. Maia**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO PROMOTOR DE UM GENE  
QUE CODIFICA UMA AQUAPORINA COM EXPRESSÃO ESPECÍFICA EM RAIZ DE  
EUCALIPTO (*Eucalyptus grandis*)**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**MARCELA IARA RODRIGUES**

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu – 2010

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao professor Dr. Ivan de Godoy Maia, pela orientação, dedicação, amizade, paciência, preocupação, por apoiar minhas ideias mirabolantes, pelo zelo durante meu processo de amadurecimento e despertar para a pesquisa científica. Agradeço de coração por acreditar em mim e torcer pelo meu sucesso.
- ❖ Aos meus pais, pela força que me transmitiram, pela compreensão, pela preocupação, pelo apoio financeiro, por nunca deixar de acreditar em mim e investir nos meus sonhos. Sem o amor e o apoio ambos eu não teria chegado até aqui hoje.
- ❖ As minhas queridas irmãs Carolina e Camila, pela amizade, conversas e momentos de descontração.
- ❖ Ao Renato Paschoal, pelo amor, carinho, companheirismo e principalmente pela compreensão e paciência nos meus momentos de ausência ou de nervoso. Simplesmente por estar ao meu lado e me fazer muito feliz.
- ❖ Aos meus colegas de laboratório, Carol, Rodrigo, Fábio, Larissa, Alessandras, Layra pelas discussões, auxílio, pela amizade, e companheirismo. E também e a Cíntia que mesmo longe estava sempre pronta a me auxiliar e se tornou uma grande amiga.
- ❖ Agradeço muito ao Dr. Flavio Sasaki pelo apoio e dedicação em me ensinar coisas novas, me auxiliar nas discussões, nas filogenias e pela sua calma e tranquilidade invejáveis.
- ❖ Agradeço especialmente a pós-doc Juliana Bravo, por ser mais que uma tutora ou co-orientadora, mas por ser minha amiga, por ficar comigo nos finais de semana de madrugada e até nos feriados trabalhando no laboratório, por estar sempre pronta a me ajudar, por se preocupar, simplesmente por existir e me tornar uma pessoa melhor como pesquisadora.
- ❖ As minhas amigas de graduação, Nathali, Paula, Fernanda, Renata, Larissa, Ayesha, Bianca a quem devo todos os momentos maravilhosos da minha vida acadêmica, com quem dividi medos, angústias, preocupações....Contudo recebi muito mais, elas foram minha segunda família, meu ponto de apoio

num lugar estranho e a princípio incomodo, porém foi se tornando um lugar para se chamar de lar. Devo a vocês os quatro melhores anos da minha vida, nunca as esquecerei!

- ❖ - Á todos os professores que gastaram uns minutos da sua vida para me transformar numa pessoa mais culta e instruida, que se esforçaram paara tornar as coisas mais dificeis em algo agradável, e que alem de serem simplesmente professores se tornaram amigos e pessoas muito queridas que serão lembrados sempre.
- ❖ Á BIOXLIII, uma sala única, talvez não seja a melhor, nem a mais perfeita, mas suficientemente maravilhosa e unida quando se mais precisa, companheira e disposta a enfrentar as dificuldades e lutar pelos nossos direitos.
- ❖ Tambem ao amigos queridos que dixei em minha terra natal, que , apesar da distancia e dos sumissos, sempre estiveram ao meu lado me dando força e conforto, e que sei que estão torcendo pelo melhor pra mim como eu torço por eles. Obrigada por existirem e por serem meus amigos eternos!
- ❖ Aos meus mibichinhos que foram meu conforto e meus verdadeiros compaheiros, me fazendo companhia e me dando muito carinho...
- ❖ - Ao apoio financeiro do CNPq.
- ❖ Agradeço a todos que passaram em minha vida e fizeram parte dessa jornada incrível de superação, transformação e amadurecimento pessoal e profissiona, mesmo aquele que ficaram por alguns minutos, mas que foram minutos suficientes para alterar a rota e me fazer chegar ao final de mais essa jornada Que hoje se tornou um novo começo!
- ❖ Agradeço a Deus por tornar tudo possivel e por me confortar nos momentos dificeis e por estar sempre comigo...

.OBRIGADA A TODOS POR ESTAREM NA MINHA VIDA!!!!!!!!!!

## RESUMO

A biotecnologia define-se pelo uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade. É importante frisar que uma das principais vantagens da biotecnologia moderna voltada para a área vegetal é a de poder gerar estratégias de melhoramento aplicáveis a diferentes culturas. Uma das principais estratégias de ação nessa área trata da produção de plantas geneticamente modificadas com transgenes de interesse. Nesse contexto, a identificação e caracterização de promotores com padrão de expressão tecido-específico é essencial para que a expressão de tais transgenes em plantas de interesse agrônômico e florestal, como em eucalipto, fique limitada a determinados órgãos/tecidos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo clonar e sequenciar a região promotora de um gene com expressão específica em raiz de eucalipto cujo produto gênico tem similaridade a uma aquaporina. Uma vez clonado, o promotor foi introduzido em vetor binário e inserido em plantas de tabaco visando a sua caracterização funcional. Além disso, a expressão do gene em estudo foi investigada em eucalipto, e uma análise filogenética comparativa com outras angiospermas foi empreendida.

## SUMÁRIO

Introdução geral.....	09
<b>Capítulo 1</b>	
1) Introdução.....	15
2) Objetivos.....	18
3) Materiais e Métodos.....	19
3.1 Isolamento das regiões promotoras.....	19
3.2 A técnica de <i>genome walking</i> (GW).....	19
3.2.1- Extração de DNA genômico de eucalipto.....	19
3.2.2- Construção das bibliotecas de GW e realização da PCR <i>nested</i> .....	20
3.2.3- Desenho dos oligonucleotídeos gene-específicos (GSPS).....	21
3.3 Clonagem e sequenciamento dos produtos de amplificação.....	22
3.4 Confirmação da identidade das seqüências clonadas.....	22
3.5 Análise das seqüências geradas.....	23
3.6 Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado.....	23
3.7 Transformação do vetor binário em células competentes de <i>agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
3.8 Preparação da cultura de <i>a. Tumefaciens</i> , transformação dos discos foliares de tabaco e regeneração das plantas transformadas.....	24
3.9 Análises moleculares das plantas transformadas.....	25
3.10 Ensaio histoquímico da atividade gus em tabaco.....	26
4) Resultados e Discussão.....	26
4.1 Isolamento da região promotora.....	26
4.2 Clonagem e sequenciamento dos produtos de amplificação.....	27
4.3 Análise das seqüências geradas em bancos de dados de promotores.....	28
4.4 Construção cassete de expressão.....	29
4.5 Transformação de tabaco ( <i>nicotiana tabacum</i> ) com <i>agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
4.6 Análise molecular de plantas transformadas.....	32
4.7. Ensaio histoquímico da atividade GUS em tabaco.....	33
5) Conclusões.....	34

## Capítulo 2

1) introdução.....	35
1.1 Origem das famílias gênicas.....	35
1.2 Família gênica aquaporina.....	36
2) Objetivo.....	41
3) Materiais e Métodos.....	42
2.1 Banco de dados.....	42
2.2 Alinhamento das sequências geradas e análise filogenética.....	42
3) Resultados e Discussão.....	43
4) Conclusão.....	46
6) Anexo.....	47
7) Referências Bibliográficas.....	50

## LISTA DE TABELAS, GRAFICOS E FIGURAS

### Tabelas:

Tabela 1. Oligos gene-específicos usados na técnica de <i>genome walking</i> .....	22
Tabela 2. Elementos <i>cis</i> -regulatórios relevantes encontrados na análise do promotor em estudo no plantcare.....	29

### Figuras:

Figura 1. Fluxo cadeia produtiva dos produtos florestais madeireiros e não madeireiros (ABRAF 2010).....	12
Figura 2. Sequência do est EGSBRT3120e07.g que faz parte do cluster egeprt3362h10.g.....	19
Figura 3. Esquema representativo das etapas de extração de DNA genômico. ....	20
Figura 4. Representação esquemática da metodologia de <i>genome walking</i> .....	21
Figura 5. Amplificação do fragmento genômico por GW. ....	27
Figura 6. Sequência consensual de nucleotídeos do fragmento amplificado por GW.....	27
Figura 7. Produto de amplificação por PCR obtido para o candidato EGSBRT3120e07.g, para confirmação da inserção da sequência clonada.....	28
Figura 8. Representação esquemática do cassete de expressão contendo o fragmento aqua em fusão transcricional com o gene <i>uida</i> (gus) inserido no vetor binário pcambia-1381z.....	30

Figura 9. Amplificação do fragmento aqua com os oligos contendo os sítios para as enzimas de restrição <i>hindiii</i> e <i>ncoi</i> .....	30
Figura 10. Verificação da inserção do cassete no vetor <i>pcambia 1381z</i> .....	31
Figura 11. Etapas de transformação de tabaco.....	32
Figura 12. Confirmação da inserção do cassete nas linhagens transformadas de tabaco.....	33
Figura 13. Padrão de expressão do cassete Aqua1 em plântulas de tabaco transformado com 9 dias após germinação.....	34
Figura 14. Diagrama esquemático da localização das subfamílias de aquaporinas em planta.....	38
Figura 15. Árvore filogenética construída a partir de sequências de aminoácidos de aquaporinas das subfamílias TIP, PIP, NIP E SIP de <i>Arabidopsis thaliana</i> em comparação com a aquaporina de <i>Eucalyptus grandis</i> em estudo.....	44
Figura 16. Árvore filogenética construída a partir de sequências de aminoácidos de aquaporinas da subfamília TIP, das espécies <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Populus trichocarpa</i> , <i>Vitis vinifer</i> e a sequencia em estudo de <i>eucalyptus grandis</i> . Análise utilizando o método de neighbor joining, com 1000 réplicas de bootstrap.....	45

Gráfico:

Gráfico 1. Evolução da área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil (2004-2009) (ABRAF 2010).....	10
Gráfico 2. Distribuição das florestas plantadas com eucalipto no Brasil por estado em 2009 (abraf 2010).....	10
Gráfico 3. Evolução da balança comercial de produtos de florestas plantadas de eucalipto no Brasil (2000-2009) (abraf 2010).....	13



## INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus*, da família Myrtaceae, possui cerca de 600 espécies adaptadas a diversas condições de solo e clima. É uma planta nativa da Austrália, mas extensamente cultivada em todo o mundo devido a sua curta rotação de madeira e capacidade de gerar uma grande variedade de produtos. O Eucalipto foi bem sucedido no Brasil pelo seu rápido crescimento, atingindo o ponto de corte em apenas sete anos, e pela sua grande tolerância à ambientes agressivos, aspecto que envolve muitas adaptações eficazes como: crescimento indeterminado, adaptação à seca e a incêndios, resistência a insetos, tolerância a acidez do solo e baixa fertilidade (Rockwood *et al.*, 2008).

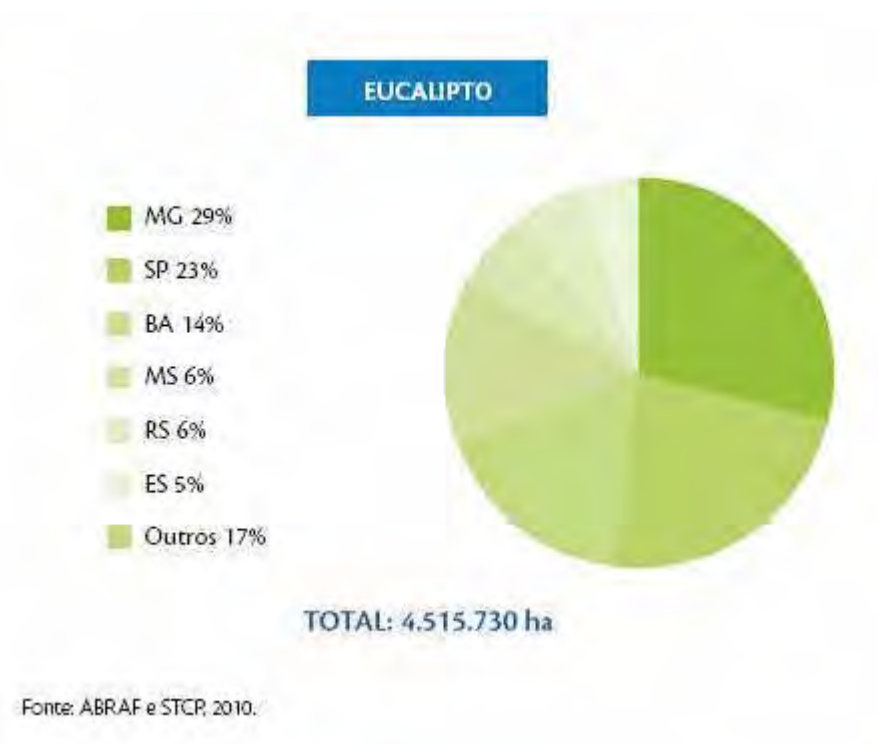
De acordo com Rockwood e colaboradores (2008), quatro espécies e seus híbridos (*Eucalyptus grandis* (EG), *E. urophylla* (UE), *E. camaldulensis* e *E. globulus*) respondem por cerca de 80% das plantações de eucalipto em todo o mundo, sendo EG a espécie mais amplamente utilizada no plantio florestal em áreas tropicais e subtropicais. É no Brasil, e em vários outros países da América Central e do Sul, onde se encontram as maiores áreas de plantio de EG e de seus híbridos com outras espécies. Sua importância advém da qualidade superior de sua madeira, do rápido crescimento, e da elevada resistência às doenças, sendo utilizado amplamente no setor industrial. É uma espécie que possui qualidades excelentes, superando qualquer uma das demais espécies.

A área de florestas com eucalipto está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura, ou em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura, com crescimento médio no país de 7,1% ao ano entre 2004/2009, conforme demonstra o Gráfico 1. Uma expansão de mais de 1 milhão de hectares na área plantada nos últimos 5 anos (crescimento acumulado de 41,1% no período) pode ser observada. Nesse cenário, 56% (2.534.240 ha) das áreas com florestas plantadas de eucalipto no Brasil (até 2009) se localizam na região Sudeste, com destaque para o estado de Minas Gerais (1.300.000 ha) seguido por São Paulo (1.029.670 ha) e Bahia (628.440 ha), respectivamente, com participação de 29%, 23% e 14% do total do país (Gráfico 2) (ABRAF 2010).



Fonte: ABRAF e STCP, 2010.

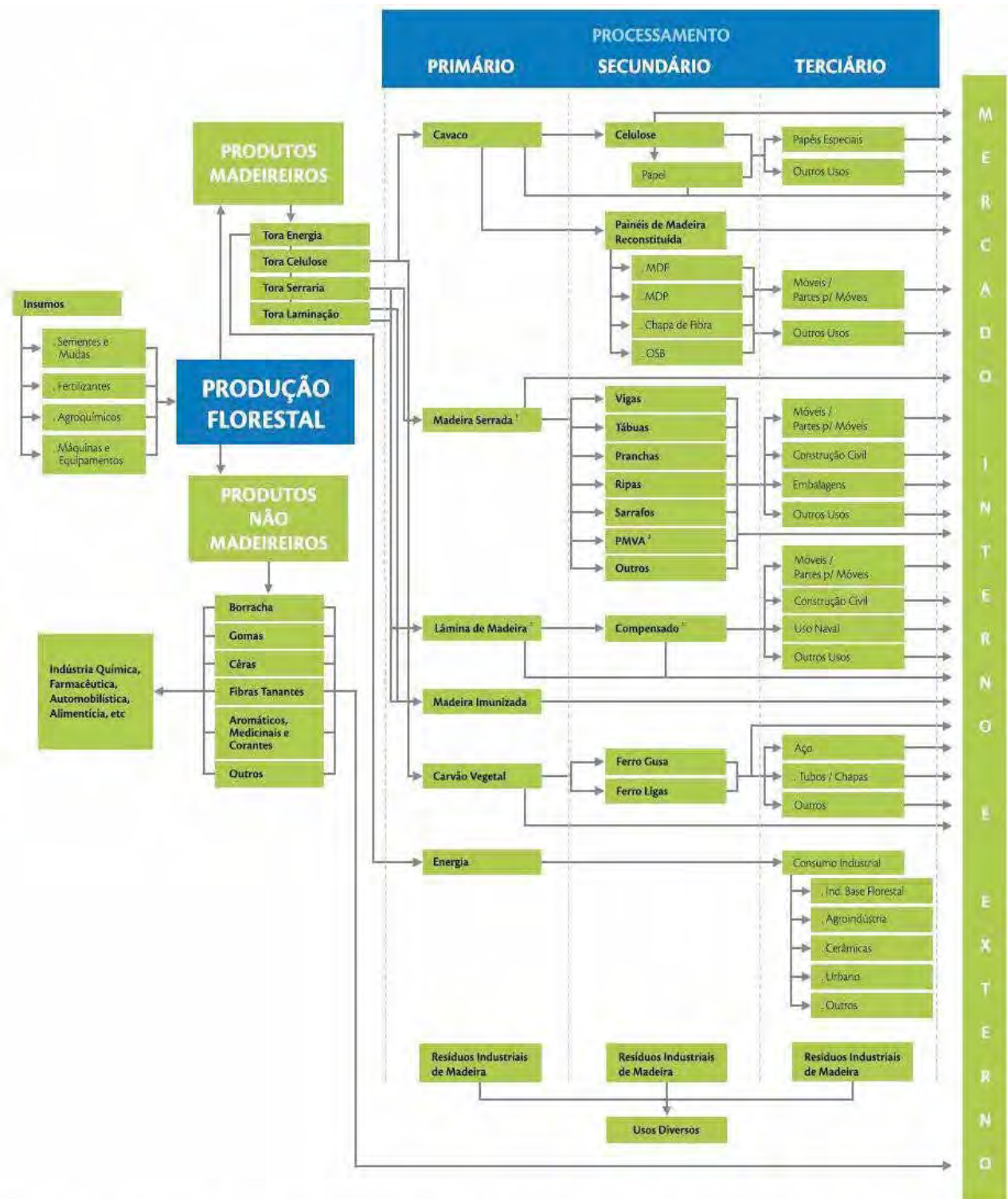
Grafico 1. Evolução da área de florestas plantadas com eucalipto no Brasil (2004-2009) (ABRAF, 2010).



Fonte: ABRAF e STCP, 2010.

Grafico 2. Distribuição das florestas plantadas com eucalipto no Brasil por estado em 2009 (ABRAF, 2010).

Os produtos provenientes das plantações florestais de eucalipto são destinados principalmente para a fabricação de produtos madeireiros como: chapas, lâminas, compensados, aglomerados, carvão vegetal, madeira serrada, celulose e moveis (Mora & Garcia, 2000). Contudo ainda são extraídos dessas plantações produtos não madeireiros como: o látex, as resinas, ceras, gomas, fibras tanantes, corantes, e óleos aromáticos ou essenciais, e cascas, obtidos geralmente através de extração não destrutiva (Figura 1) (ABRAF, 2010).



Fonte: STCP 2010, baseado em VIEIRA, L. Setor Florestal em Minas Gerais: caracterização e dimensionamento, Belo Horizonte – Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.  
 1 PMS (Produtos de Madeira Sólida) – madeira serrada, compensado, lâminas, PMVA.  
 2 PMVA (Produtos de Maior Valor Agregado) – portas, janelas, molduras, pisos, desks, dormentes, outros.

Figura 1. Fluxo da cadeia produtiva dos produtos florestais madeireiros e não madeireiros (ABRAF, 2010).

Hoje, o mundo inteiro reconhece o uso de madeira do eucalipto como de excelente fibra para a produção de papel de melhor qualidade. Além de ser economicamente viável, devido ao seu crescimento rápido, permite que tenha maior produtividade sem prejuízo para a natureza (Mora & Garcia, 2000). De acordo com a ABRAF (2010), o consumo de celulose e papel é um dos principais termômetros de desempenho econômico e das atividades industriais dos países. Em 2009, o Brasil se tornou o quarto maior fabricante mundial de celulose, passando à frente de países produtores tradicionais como a Finlândia e Suécia, o que acarretou um aumento nas exportações brasileiras de produtos de florestas plantadas que atingiram US\$ 5,6 bilhões em 2009, sendo que as exportações totais do Brasil chegaram a US\$ 153,0 bilhões no mesmo ano (Gráfico 3).



Fonte: SECEX (2010) adaptado por STCP.  
<sup>1</sup> vide Notas Metodológicas – Capítulo 5 deste Anuário.

Gráfico 3. Evolução da balança comercial de produtos de florestas plantadas de eucalipto no Brasil (2000-2009) (ABRAF, 2010).

A superioridade da produtividade florestal que o Brasil apresenta em relação a outros países com forte tradição em florestas plantadas (Gráfico 3), como é o caso da Suécia, além de outros países como Portugal, África do Sul, Estados Unidos, Canadá e Chile, advém da evolução tecnológica, especialmente porque o setor dispõe de material genético melhorado (uso de sementes e clones) e de tecnologias avançadas no ramo da biotecnologia. Isso permitiu ao Brasil ocupar posição de destaque com relação à alta produtividade florestal de suas espécies plantadas, tanto coníferas quanto folhosas (ABRAF 2010).

A partir dos anos 80, em função do aumento da conscientização pela maior proteção e preservação de florestas naturais, juntamente com a demanda cada vez maior por madeira, o setor florestal adotou inovações tecnológicas para utilizar, de forma mais eficaz, as florestas plantadas (Dossa et. al., 2002). O setor investiu permanentemente em pesquisa e desenvolvimento florestal, através de métodos diferenciados e de novas tecnologias, com o propósito de aumentar a produtividade florestal e mitigar condições adversas decorrentes do uso intensivo da terra. E destas intervenções tecnológicas resultam ganhos em produtividade, aumento de qualidade da matéria prima (madeira e fibra), otimização do teor de lignina, maior rendimento em celulose, a densidade da madeira, poder calorífico, presença de tiloses, o teor de cinzas, e outras características de interesse de cada setor de transformação da madeira (ABRAF 2010).

A importância das plantações florestais de eucalipto, além de econômica, é também ambiental, destacando-se como principal instrumento para a recuperação de áreas desmatadas. A utilização da madeira de reflorestamento tem contribuído substancialmente para reduzir a pressão sobre as florestas naturais e auxiliado a minimizar o impacto causado no clima, em especial no regime de ventos e chuva, causado pelo desmatamento (Mora & Garcia, 2000).



## **CAPÍTULO 1**

### **1) INTRODUÇÃO**

Devido aos problemas que surgem com o uso de pesticidas, aumenta a necessidade de um manejo mais racional dos agroecossistemas, com emprego de práticas integradas, incluindo a resistência genética de cultivares, o uso de elementos sadios de propagação vegetal, e o controle biológico natural e aplicado. Com isso surgem as abordagens biotecnológicas que representam uma alternativa atraente na agricultura contemporânea como complemento das abordagens tradicionais de melhoramento genético vegetal ou tratamentos químicos das culturas (Altpeter *et al.*, 2005).

Entre os elementos que têm contribuído para o crescimento da biotecnologia vegetal destacam-se inúmeros genes identificados por intermédio dos projetos de sequenciamento de genomas e transcriptomas de espécies importantes, que passaram a tornar viável a obtenção de plantas com características melhoradas via modificação genética.

O impacto dessa tecnologia sobre o melhoramento genético de plantas e sobre a pesquisa básica é considerável, pois novos genótipos podem ser criados de forma dirigida aos interesses da agricultura sustentável e em curto tempo. Plantas transgênicas, cultivadas em diversos países, ocupando cerca de 13 milhões de hectares, vêm sendo comercializadas bem como utilizadas para a investigação das funções e regulação de genes isolados (Brasileiro & Carneiro, 1998). Dentre as ferramentas moleculares necessárias para a produção de transgênicos, a identificação e caracterização de promotores que viabilizem a expressão em determinado órgão, mediante determinado estímulo, representa uma prioridade.

As seqüências promotoras são cruciais para a regulação gênica. Em geral, o promotor é a parte do gene que tem a função de mediar e controlar o início da transcrição, estando localizado imediatamente a montante da região a ser transcrita (Werner, 1999). O uso de promotores com padrões específicos de expressão em construções gênicas visando à transformação de plantas de interesse é importante tanto para evitar o

desperdício de energia produzindo proteínas de interesse em células/tecidos não relevantes, quanto para evitar distúrbios metabólicos (Vicentini *et al.*, 2005).

Em contraste às espécies anuais cultivadas (como milho, soja, etc), as espécies florestais, como o eucalipto, são consideradas semidomesticadas devido ao seu longo ciclo reprodutivo. Atualmente, os mais avançados programas de melhoramento de espécies coníferas, por exemplo, encontram-se ainda em sua quarta geração, sendo o mesmo verdadeiro para o eucalipto (Séguin *et al.*, 1998). O melhoramento de árvores é, portanto, um processo normalmente longo e limitado pela taxa de crescimento das espécies envolvidas. Nesse cenário, a engenharia genética, auxiliada pelas metodologias de cultura de tecidos que permitem a produção de um grande número de propágulos, pode acelerar esse processo pela transferência direta de características simples. Assim, quanto mais conhecimento sobre a biologia molecular das árvores for adquirido, maiores serão as oportunidades para seu melhoramento (Séguin, *et al.*, 1998).

Recentemente em nosso laboratório, alguns candidatos com expressão específica ou preferencial em determinados órgãos/tecidos puderam ser identificados em eucalipto (Sasaki, 2008, Ribeiro, 2009) e em outras espécies vegetais (Brandalise, 2007; Hoshino, 2007), e algumas das seqüências promotoras correspondentes foram clonadas. Apesar desses esforços, a disponibilidade de informações sobre genes com expressão órgão/tecido-específica e de promotores com tais características é ainda insipiente, especialmente em eucalipto.

Como parte de um projeto abrangente voltado para a identificação e clonagem de promotores com expressão órgão/tecido-específica em eucalipto, nosso grupo identificou recentemente, no banco de dados do Projeto EST do Eucalipto (Forests), uma sequência expressa (EST) com expressão específica em raiz cujo produto gênico apresenta alta similaridade com uma aquaporina presente em raízes de milho (Lopez *et al.*, 2004).

A atividade das aquaporinas (canais de água) nas plantas, localizadas em vacúolos ou na membrana plasmática, possibilita aumento da permeabilidade da água nas membranas (Ohshima *et al.*, 2001), o que constitui um passo importante em vários processos fisiológicos, como alongamento celular, a germinação das sementes, e osmorregulação (Maurel, 2007).



Uma vez que a raiz pode ajustar finamente a sua condutividade hidráulica em resposta as alterações ambientais, tais como um aumento da salinidade do solo, carências nutricionais, ciclos de dia e noite, ou anaerobiose (Gomes *et al.*, 2009), acredita-se que as aquaporinas estejam envolvidas nessa regulação (Heymann & Angel, 1999), sendo consideradas canais multifuncionais. Várias aquaporinas têm sido associadas à germinação e aos processos de amadurecimento dos frutos. Nestes casos, compostos osmoticamente ativos são gerados e distribuídos, ou ainda, grandes quantidades de precursores são transportadas para dentro das células e tecidos (Schaffner, 1998).

Deste modo, as aquaporinas poderiam contribuir para a tolerância à seca, facilitando transporte da água entre os diferentes órgãos e no nível celular por manutenção da homeostase hídrica (Kjellbom *et al.*, 1999; Tyerman *et al.*, 2002). Segundo resultados apresentados por Aharon e colaboradores (2003), o transporte de água através de aquaporinas da membrana plasmática representa um fator limitante para o crescimento das plantas e vigor sob condições favoráveis e que, mesmo plenamente irrigadas, as plantas enfrentam limitado transporte de água. Em contrapartida, o reforço desse transporte através das aquaporinas da membrana plasmática não apresenta qualquer efeito benéfico sob estresse salino, e tem um efeito deletério durante o estresse hídrico (Aharon *et al.*, 2003).

A disponibilidade de um gene com expressão específica em raiz de eucalipto representa uma ótima oportunidade para empreender estudos visando a obtenção de promotores tecido-específicos nessa importante espécie.

## 2) OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização funcional da região promotora de um gene de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) com expressão específica em raiz. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- A) Construir um cassete de expressão contendo o referido promotor em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS) e inseri-lo em vetor binário para transformação de plantas.
- B) Obter e caracterizar plantas transgênicas de tabaco transformadas com o cassete de expressão descrito acima.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento das regiões promotoras

O EST utilizado para clonagem da região promotora em estudo foi selecionado *in silico* no banco de dados do Projeto EST do Eucalipto (Forests) com base na sequência de um gene candidato de milho (*Zea mays*) que apresenta expressão específica em raiz (Lopez *et al.*, 2004). O EST de eucalipto correspondente (número EGSBRT3120E07.g) (Figura 01) foi previamente validado como apresentando expressão em raiz. (Sasaki, 2008)

```
CGAGTTCTCTTTCTAAAGTGGTTGATTCTAGTTCTTTTCGATCGAGCAAACATGGTGAAGCTCGCGTTCGGTGGCTTTGGTGACTCCTTCAGCGT
AGGGTCCCTGAAAAGCTATCTCTGCGAGTTTCATCGCGACCCCTCCTCTTCGTGTTTCGCCGGCGTCGGGTCCGCCATCGCTTATGGAAGCTCACG
GCGGATGCAGGCCTGGACCCGGCCGGGCTAGTCGACAGTGGCCGTGGCCACGCGTTCGCCCTGTTTGTGGGGGTATCCATCGCGGCGAACATCT
CCGGCGGCCATCTGAATCCGGCGGTACGTTCCGGTTGGCCGTGGAGGCAACATCACCATCTTGGACTGGCATCTTCTACTGGATCGCCCAATG
CCTCGGCTCGATCGTCGCTGCCTCCTCCTAAAATTCTGTCACCGGCACCGAGAGCGTACCAACCCATGGAGTTGCTGCTGGCATGAACCGGATT
GAAGGCCTAGTCATGGAGTCTGTCATCACCTTCGCGCTGGTCTACACGGTGTACGCCACCGCAGCCGACCCCAAGAAGGGCTCGATAGGGATCA
TCGCCCCCATTGCCATCGGCTTCATCGTCGGCACCAACATCCTGGCCCGCCGCGTTCAGTGGCGGGTCCATGAACCCCGCCGCTCTTTCGG
CCCGNCGTGGTCAGCGGGCACTTCTCGGAGAACTGGATCTACTGGTTCGGCCCGCTCGTCGGGGGGAGGGCTCGCCGGGCTCGTGTACGGCGAC
ATCTTCATCGGGTCTACCCCTCGGGCCCCGCTCTCAGGACATGCTTGAGAGACAAAGAGCTCCTGTGCTCGGTGTTTATTAATTACATACC
TGGGGGGGTTTTCTGTTGGCC
```

**Figura 2.** Sequência de nucleotídeos do EST EGSBRT3120E07.g que faz parte do cluster EGEPR3362H10.g. Em amarelo – codon ATG predito na região codificadora do EST.

#### 3.2 A técnica de *genome walking* (GW)

##### 3.2.1- Extração de DNA genômico de eucalipto

A extração de DNA genômico (Figura 02) foi baseada no protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1998). Foram utilizados aproximadamente 150 mg de tecido foliar macerado em nitrogênio líquido com posterior solubilização em 700 µl do tampão de extração CTAB pré-aquecido (Anexo 6.1) e incubação por 30 min a 65°C. Adicionou-se em seguida 600 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico na proporção 24:1) seguido de uma centrifugação a 14000g durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e ao mesmo foi adicionado 600 µl de CIA, centrifugando a amostra nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi coletado, e nele foram adicionados 700 µl de isopropanol frio (-20°C). A amostra foi precipitada a -20°C por no mínimo 30

min com subsequente centrifugação a 7500g por 5 min. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% e centrifugado a 7500g por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado com TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA – pH 8.0) contendo 10 µg/ml de RNase, e incubado em banho-maria a 37°C por 30 a 120 min para eliminar contaminações com RNA. A quantificação do DNA foi feita em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

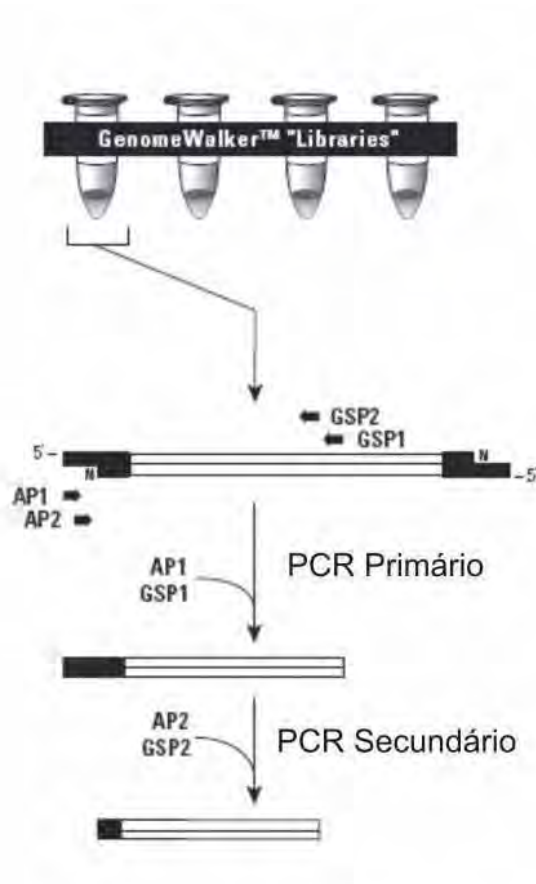


**Figura 3.** Esquema representativo das etapas de extração de DNA genômico. Fonte: CENARGEN/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

### 3.2.2- Construção das bibliotecas de GW e realização da PCR *nested*

Para a construção das bibliotecas foram utilizadas alíquotas de DNA genômico de eucalipto (2,5 µg) digeridas durante 16 horas a 37°C com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI* separadamente. Uma alíquota da reação de digestão (5 µl) foi aplicada em gel de agarose 1% para verificar a qualidade da digestão, sendo o DNA restante purificado via extração clorofórmio/fenol e ligado aos adaptadores. Tanto a purificação quanto a ligação dos adaptadores foram processadas seguindo as instruções do fabricante do kit *Universal GenomeWalker* (Clontech). Após a ligação dos adaptadores, as amplificações das seqüências promotoras foram realizadas conforme as especificações do kit (Anexo 6.2 e Figura 03). Para tal, utilizou-se

oligonucleotídeos gene-específicos que foram desenhados com o intuito de amplificar produtos à montante da região codificadora do gene em estudo (EST validado no banco FORESTs).



**Figura 4.** Representação esquemática da metodologia de *genome walking* (adaptada de Clontech Inc., 1999). As extremidades em preto dos fragmentos de DNA representam os adaptadores; AP1 e AP2 – oligonucleotídeos adaptadores; GSP1 e GSP2 – oligonucleotídeos gene-específicos.

### 3.2.3- Desenho dos oligonucleotídeos gene-específicos (GSPs)

Oligonucleotídeos complementares à porção 5' terminal da sequência do EST validado foram desenhados utilizando os seguintes critérios: tamanho do oligonucleotídeo (mínimo: 26 bases; ótimo: 28 bases; máximo: 30 bases); temperatura de anelamento (mínimo: 66°C; ótimo: 67°C; máximo 68°C) e conteúdo em GC (mínimo: 40%; máximo: 60%). As sequências dos oligos utilizados estão disponibilizadas na Tabela 1.

**Tabela 01-** Oligos gene-específicos usados na técnica de *Genome Walking*.

<b>Read validado</b>	<b>Primer Genome Walker</b>
EGSBRT3120E07.g	5` AGTCACCAAAGCCACCGAACGCGAGCTTC 3` - 2GSP2B(reverso)  5` ACTATAGGGCACGCGTGGT 3` - AP2 (senso)

### **4.3 Clonagem e Sequenciamento dos produtos de amplificação**

Os produtos de PCR derivados do GW foram isolados em gel de agarose 1% e purificados. Esses produtos foram clonados no vetor pGEM-Teasy (Promega) e transformados por choque térmico em *Escherichia coli* cepa DH5 alfa (Sambrook *et al.*, 1989). Mini-preparação por lise alcalina (Anexo 6.3) foi utilizada para a extração dos plasmídeos, e uma digestão com *EcoRI* foi realizada para verificar a presença dos fragmentos clonados nos tamanhos corretos, descartando assim os falsos positivos. Os transformantes validados foram crescidos em 1,5 ml de meio Luria Bertani (LB) líquido, volume ao qual foi adicionado glicerol líquido autoclavado (15%; v/v) para posterior estocagem em freezer -80°C. A reação de sequenciamento (Anexo 6.4) foi realizada com um kit comercial de “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos M13 senso e antisenso. Os DNAs plasmidiais contendo os produtos de PCR derivados do GW foram utilizados como molde. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

### **3.4 Confirmação da identidade das seqüências clonadas**

A estratégia adotada para a confirmação da identidade das seqüências clonadas baseou-se na realização de uma PCR utilizando um oligonucleotídeo senso desenhado internamente à região promotora seqüenciada e o outro oligonucleotídeo reverso complementar a seqüência do EST validado. Os pares de oligonucleotídeos utilizados para o candidato EGSBRT3120E07.g foram: AqHind (senso 5' CCG CAA GCT TGG CTG GTA

GTC ATT CC 3') e AqNcoI (reverso 5' GGG CCA TGG TTT GCT CGA TCG A 3') com amplicon de 900 bp.

### 3.5 Análise das sequências geradas

As seqüências obtidas foram analisadas para a retirada de seqüências do vetor, com a ferramenta VecScreen (NCBI), e alinhadas para a geração de uma seqüência consenso utilizando o programa BioEdit (Hall, 1999). A seqüência consensual do promotor foi comparada à seqüência do EST candidato para determinação dos pontos de sobreposição, e submetida no banco de dados de elementos regulatórios de plantas PlantCARE para a identificação dos possíveis elementos regulatórios.

### 3.6 Construção do cassete de expressão contendo o promotor amplificado

Para a construção do cassete de expressão foi utilizado o vetor binário pCAMBIA-1381z (Cambia), que contém um íntron inserido na região codificadora do gene repórter *uidA* (GUS) que codifica a  $\beta$ -glucoronidase. O fragmento correspondente ao promotor, inicialmente inserido no vetor pGEM-Teasy, foi amplificado por PCR visando a adição dos sítios de restrição *HindIII* (5' terminal) e *NcoI* (3' terminal) em suas extremidades. O sítio *NcoI* permitiu a correta inserção do promotor em fusão transcricional com o início da região codificadora do gene *uidA* presente no pCAMBIA. O produto de amplificação obtido foi purificado em gel de agarose, digerido com as enzimas de restrição citadas e inserido no vetor pCAMBIA igualmente digerido.

Após a ligação, células competentes da cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989) foram transformadas empregando choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de tripton, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select Agar* em água deionizada, com pH igual a 7,0) adicionado de 100  $\mu$ g/ml de canamicina. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

Para verificar a correta inserção do promotor no vetor binário foi realizada a digestão do plasmídeo recombinante com enzima de restrição e eletroforese do produto de digestão em gel de agarose 1%, bem como uma reação de PCR utilizando um oligonucleotídeo promotor-específico e um oligonucleotídeo específico do gene repórter *uidA*. O produto obtido foi então purificado em gel de agarose e sequenciado.

### **3.7 Transformação do vetor binário em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens***

O cassete de expressão contendo o gene *uidA* sobre controle do promotor em estudo inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z foi transformado nas células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA4404. O vetor binário pCAMBIA-1381z possui gene de resistência a canamicina como agente de seleção bacteriano. A produção das células competentes e transformação foram baseadas no protocolo descrito por Lacorte & Romano (1998). Após a transformação, análises de PCR de colônia empregando oligonucleotídeos específicos foram realizadas a fim de confirmar a transformação das agrobactérias.

### **3.8 Preparação da cultura de *A. tumefaciens*, transformação dos discos foliares de tabaco e regeneração das plantas transformadas**

Cem microlitros de um pré-inóculo, obtido a partir de uma colônia isolada da linhagem LBA4404 transformada com a construção contendo o promotor específico de raiz mais GUS, foram inoculados em 10 ml de meio líquido LB sem a presença dos antibióticos de seleção no intuito de evitar interferência dos mesmos na co-cultura com os discos foliares. A cultura foi incubada a 28°C sob agitação (150 rpm) até atingir a absorbância de 1,5 a 600 nm. Uma alíquota do inóculo foi então diluída até atingir uma absorbância de 0,1 a 600 nm, e utilizada na co-cultura com os discos foliares de tabaco (Aragão *et al.*, 2002).

Em um fluxo estéril, discos foliares de aproximadamente dois cm de diâmetro foram cortados de folhas jovens de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1 cultivado *in vitro*) e colocados em uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril no intuito de manter os explantes hidratados. Um ml da cultura diluída de *A. tumefaciens* foi adicionado a 10 ml de LB líquido num tubo de centrifuga estéril de 50 ml. Com uma pinça estéril, os explantes foram colocados no tubo e a co-cultura mantida à temperatura ambiente por 5 min sob leve agitação. Em seguida, os discos foliares foram transferidos para uma nova placa de Petri com papel de



filtro estéril para retirar o excesso de bactérias. Os discos foliares co-cultivados foram transferidos, com a face adaxial em contato com o meio, para placas de Petri contendo meio MS sólido (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com sacarose 30 g/l, 2 µg/ml de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,1 µg /ml de auxina ácido naftalenoacético (ANA) para a indução de calos. As placas foram inicialmente mantidas no escuro por 48 horas a 28°C, tempo necessário para a infecção da bactéria. Posteriormente, os discos foram transferidos para placas de Petri contendo MS sólido adicionado de 100 µg/ml de higromicina, 500 µg/ml de cefotaxima, 1 µg/ml de BAP e 100 µg/ml ANA. As placas foram mantidas por aproximadamente 30 dias em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz até o surgimento de calos. Depois, as plântulas formadas a partir desses calos foram individualizadas em potes de vidro contendo meio de enraizamento (meio MS descrito acima, com ausência de BAP) visando a formação das raízes.

Discos foliares sem infecção por *A. tumefaciens* foram usados como controle positivo de regeneração dos explantes em meio MS com BAP e ANA, e como controle negativo para testar posteriormente o efeito do antibiótico de seleção em tecidos não transformados. As plantas enraizadas foram transferidas para vasos, aclimatadas e colocadas em casa de vegetação para obtenção das sementes.

### **3.9 Análises moleculares das plantas transformadas**

A confirmação da inserção do cassete de expressão foi empreendida empregando PCR e DNA genômico extraído a partir de tecido foliar das linhagens transgênicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As reações de PCR foram conduzidas utilizando 15 ng/µl de DNA genômico extraído de cada linhagem transformada e um controle extraído de tabaco selvagem (WT). Para tal foi usado tampão de PCR (1X), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleotídeo (dNTP mix), 0,2 µM dos oligonucleotídeos promotor-específico e GUS, respectivamente, e 2,5 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (5U/µl, Invitrogen). Foram empreendidos 35 ciclos de amplificação. Alternativamente a atividade GUS nos tecidos transformados foi localizada histoquimicamente através de protocolo padrão detalhado a seguir.

### **3.10 Ensaios histoquímicos da atividade GUS em tabaco**

Os ensaios histoquímicos para detecção da atividade de glucuronidase (GUS) nos tecidos transformados foram realizados empregando-se um substrato halogênico (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide; X-Gluc), que em contato com a enzima se torna azulado.

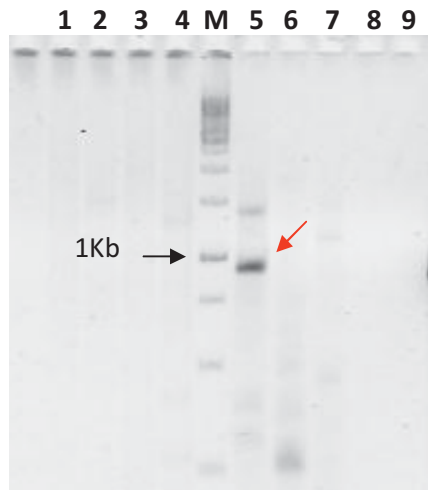
Como controle positivo foram utilizados tabacos transgênicos transformados com um cassete de expressão contendo o promotor constitutivo CaMV 35S fusionado transcricionalmente ao gene repórter GUS (cedidos pelo Prof. Dr. Márcio de Castro Silva-Filho – Departamento de Genética - ESALQ-USP). Plântulas da geração T1 com 10 dias pósgerminação foram utilizadas no experimento. O ensaio histoquímico foi realizado baseado em Jefferson *et al.* (1987) e em Lacorte & Romano (1998).

Plântulas inteiras das linhagens transgênicas AQUA1:GUS (geração T1) foram submetidas ao ensaio GUS. Essas foram inicialmente incubadas em tampão de reação contendo 100 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, 0,1 % Triton X-100, 1 mM X-Gluc (50 mg/ml) e infiltradas a vácuo por 7 min. O tempo de reação foi de 16 horas a 37°C. Após esse período as amostras foram lavadas em etanol 70 % para retirar a clorofila do material vegetal. (Jefferson *et al.*, 1987) e fotografadas.

## **4) RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento da região promotora**

O candidato EGSBRT3120E07.g, validado por RT-PCR como apresentando expressão em raiz de eucalipto (Sasaki, 2008) foi selecionado para o isolamento de sua região promotora. Para tal foram desenhados oligos gene-específicos para a amplificação da sequência promotora pela técnica de GW (Figura 04).



**Figura 5.** Amplificação do fragmento genômico por GW. Amostras de 1 a 4 – primeiro round de amplificação sendo 1- DNA digerido com *EcoRV*; 2- DNA digerido com *Dral*; 3- DNA digerido com *PvuII* e 4 DNA digerido com *SspI*. Amostras de 5 a 8 – segundo round de amplificação usando DNA da primeira amplificação (na mesma ordem). (-) controles negativos e M - GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Fermentas). A seta vermelha indica o fragmento amplificado que foi isolado para posterior clonagem.

#### 4.2 Clonagem e Sequenciamento dos produtos de amplificação

Após as amplificações usando a técnica de GW, o fragmento selecionado foi purificado em gel de agarose e clonado no vetor pGEM-Teasy. Após a clonagem, a inserção do fragmento de interesse no vetor foi confirmada por digestão dos plasmídeos recombinantes com a enzima de restrição *EcoRI*. Os clones positivos foram sequenciados com os primers M13 *Forward* e *Reverse*, em sequenciador automático.

Uma vez finalizado o sequenciamento, a sequência de nucleotídeos desse fragmento foi alinhada com a sequência do EST validado como apresentando expressão específica em raiz, e uma região de sobreposição entre elas foi observada (Figura 05). Esse resultado sugere que o fragmento clonado está efetivamente situado na porção 5' do EST usado como ponto de partida nos experimentos de GW (Figura 02).

```
GGTCACGGCCCGGGCTGGTAGTCAATCCCTCACTTCGATGACTTTCATAAATTTTCATCGTCTGTGTTACATTCTTTATCATAGAGCATTAAAGACTAGATACTGAGATAGG
CAAAACCCAGATACCTTCAATTATGCCCCGAAGGTGAAGCCGAGATAAAGAAATTAACCTTGACATGAATTGGGATGGCAAACCTCTAAGAACAGTGGGGCAAGGTTGGGCAAC
TCGCCCGCCCGCTTACTTTCATTTCCATTTCCATTTCCATTACCATTTCCATTTCCATTTCCCATATCTTCATGAAAGGATGGTGGACAATAGTGGTGCCTTATCTCGATCGTACCTTT
CCGCTATTTTATTCATGCAAAATAGCCCTTCGGCGCGTCCATTTCTCATGTTCACGAGGAAAAATGACATAAGAACATGATTAGGGTTCGATGGTCTTTGCTTCCGCGAATTATCCCT
CTAAACCACATTTAATAATCTCCCGAAGAGCGACAGGGACTCGCTTGTCTCGTTGCACGTAAATTAAGTTAAGCTGGTTGCTTATGCCATAATCGCCCATTAATACAC
ATTTAAGAATTCATCGGCGGTTGGTGGCGCCCAACCACCGCTCCACTGCATCCCGGTCCCATTTGGCCGGTGGCCGGCTGTGCCCTCTCGTCCATCTCTAGCTAAATATATAC
TCGAATTAGCCTGATAAAAGATTAAGGAGATGGATTAAAAATAAGAAAGCCACTATTCGAAAGGATGCCTTAGGGCGAGTATATAATGCCGCTTGTTCGCCGGACTTGACGCA
CAAGCTCACTGCGAAGCATAGCTAAGCGAGTTCCTTTCTAAAAGTGGTTGATTCTAGTTCTTTTCGATCGAGCAAACATGGCGAAG
```

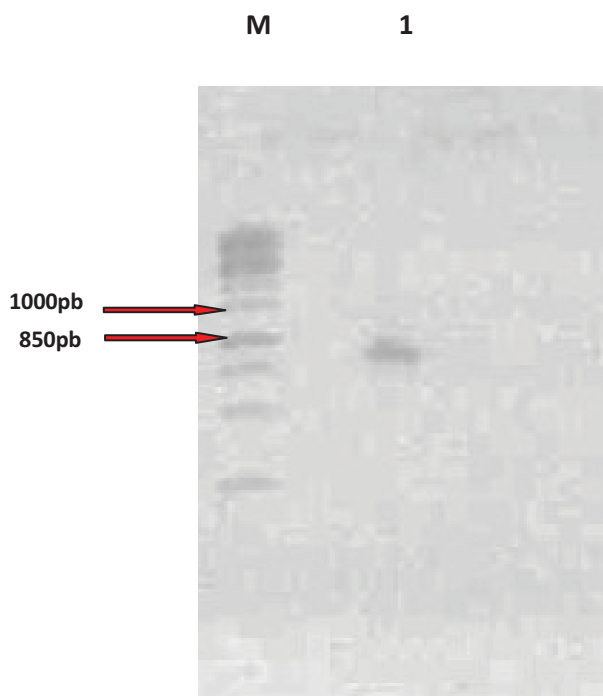
Em cinza – região de sobreposição do EST com o fragmento clonado

Vermelho – Adenina adicional presente no fragmento clonado em relação ao EST e

- Timina presente no EST ao invés de citosina do fragmento clonado.

**Figura 6.** Sequência consensual de nucleotídeos do fragmento amplificado por GW.

Para a confirmação da presença do fragmento amplificado em relação ao EST foi realizada uma reação de PCR utilizando o DNA plasmidial (contendo o fragmento clonado por GW), e oligonucleotídeos sintetizados no sentido senso do fragmento amplificado e no sentido reverso à sequência do EST depositado no banco de dados do eucalipto. Como pode ser observado na Figura 6, houve a amplificação de um fragmento de 900 pares de bases, o que confirma o posicionamento do produto amplificado por GW à montante do EST validado.



**Figura 7.** Produto de amplificação por PCR obtido para o candidato EGSBRT3120E07.g, para confirmação da a presença sequência clonada. M - GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Fermentas) 1- Produto da amplificação usando o plasmídeo pGEMT-Easy contendo o fragmento de EGSBRT3120E07.g. Gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio;

#### 4.3 Análise das sequências geradas em bancos de dados de promotores

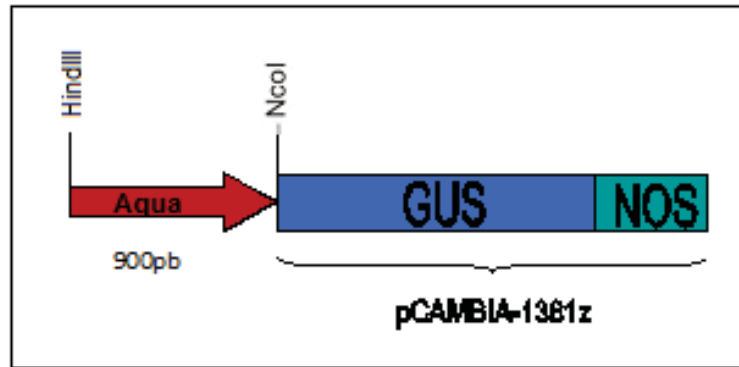
A sequência promotora obtida foi analisada quanto à presença de elementos regulatórios utilizando o banco de dados do PlantCARE (a plant *cis*-acting regulatory element database). Nessa análise foram identificados alguns elementos regulatórios que caracterizam o fragmento sequenciado como uma região promotora. Na Tabela 02 destacamos os elementos *cis*-regulatórios mais relevantes.

**Tabela 02** - Elementos *cis*-regulatórios relevantes encontrados na análise do promotor em estudo no PlantCARE.

<b>Elementos regulatórios</b>	<b>Sequência consenso</b>	<b>Função predita</b>
ABRE	TACGTG	Elemento envolvido na resposta ao ácido abscísico.
CAAT-BOX	CCAAT	Elemento comum em promotores e regiões estimuladoras da expressão gênica
CAT-BOX	GCCACT	Elemento relacionado com expressão no meristema
TATA-BOX	TATA	Indica início da transcrição
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	Envolvido na defesa e resposta ao estresse
Motif Ib	CCGCCGCGCT	Elemento envolvido na resposta ao ácido abscísico

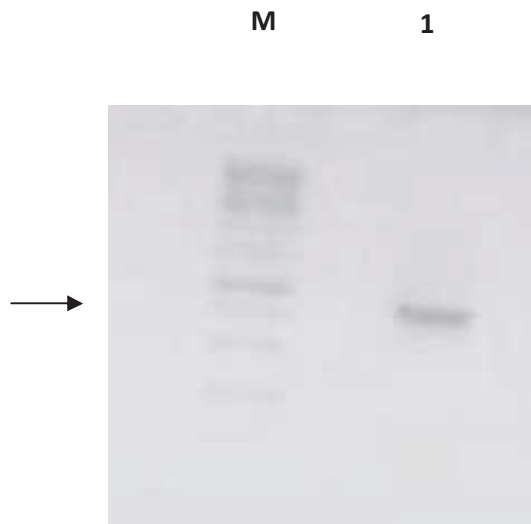
### 4.3 Construção cassete de expressão

O cassete de expressão construído (denominado Aqua) encontra-se esquematizado na Figura 07. Nele, o promotor do gene que codifica a aquaporina de eucalipto (~900 pares de bases) foi clonado em fusão transcricional com o gene repórter GUS utilizando para tal os sítios para as enzimas de restrição *Hind*III e *Nco*I.

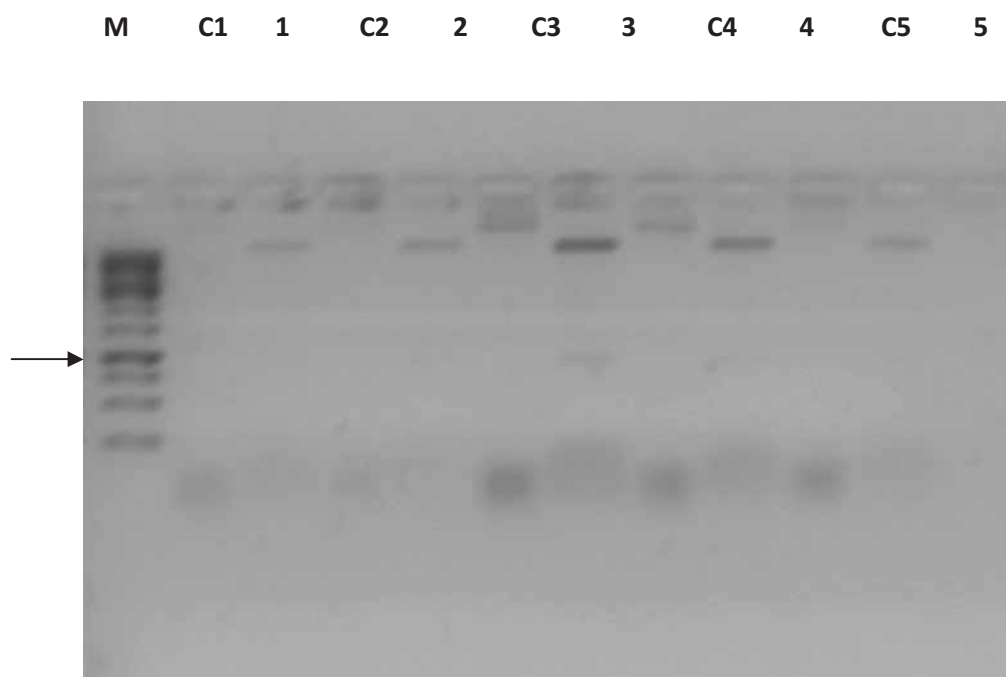


**Figura 8.** Representação esquemática do cassete de expressão contendo o fragmento Aqua em fusão transcricional com o gene *uidA* (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z. O terminador da nopalina sintetase (NOS) está representado.

Para clonagem do referido promotor em vetor binário, o fragmento correspondente foi primeiramente amplificado por PCR para adicionar dos sítios para as enzimas de restrição *HindIII* e *NcoI* (Figura 08). Após a ligação em vetor binário e transformação em *E. coli*, os clones recombinantes obtidos foram então digeridos com enzima de restrição para comprovar a inserção (Figura 9). O vetor recombinante obtido foi então inserido em agrobactéria visando a posterior transformação de tabaco.



**Figura 9.** Amplificação do fragmento Aqua com os oligos contendo os sítios para as enzimas de restrição *HindIII* e *NcoI*. Ladder 1kb da MBI Fermentas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A seta indica a posição do fragmento amplificado.



**Figura 10.** Verificação da inserção do promotor em estudo no vetor pCambia-1381z por digestão com enzima de restrição. Ladder 1kb da MBI Fermentas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A seta indica a posição do fragmento promotor clonado (~900 pb).

#### 4.5 Transformação de tabaco (*Nicotiniana tabacum* SR1)

Após os eventos de transformação via *A. tumefaciens*, os discos foliares de tabaco foram mantidos em placas contendo meio de cultura MS com os agentes de seleção próprios descritos anteriormente (Figura 10B). O experimento de regeneração foi separado em controle positivo de regeneração, sem antibióticos, e controle negativo de seleção, sem evento de transformação, visando testar a eficiência do agente de seleção higromicina B. O controle negativo após algumas semanas apresentava perda progressiva de clorofila e ausência de calos, enquanto o controle positivo e os explantes infectados com agrobactéria apresentavam calos nas partes transformadas (Figura 10C).

Após várias semanas houve a indução da parte aérea nos explantes. Nessa etapa transferiu-se a parte aérea para potes com meio MS adicionado de ANA para induzir o enraizamento, mantendo sempre os agentes de

seleção (Figura 10D). Após algumas semanas desenvolveu-se o sistema radicular nos tabacos transformados. Nesse estágio, as plantas foram transferidas para copos plásticos e aclimatadas para o novo ambiente.

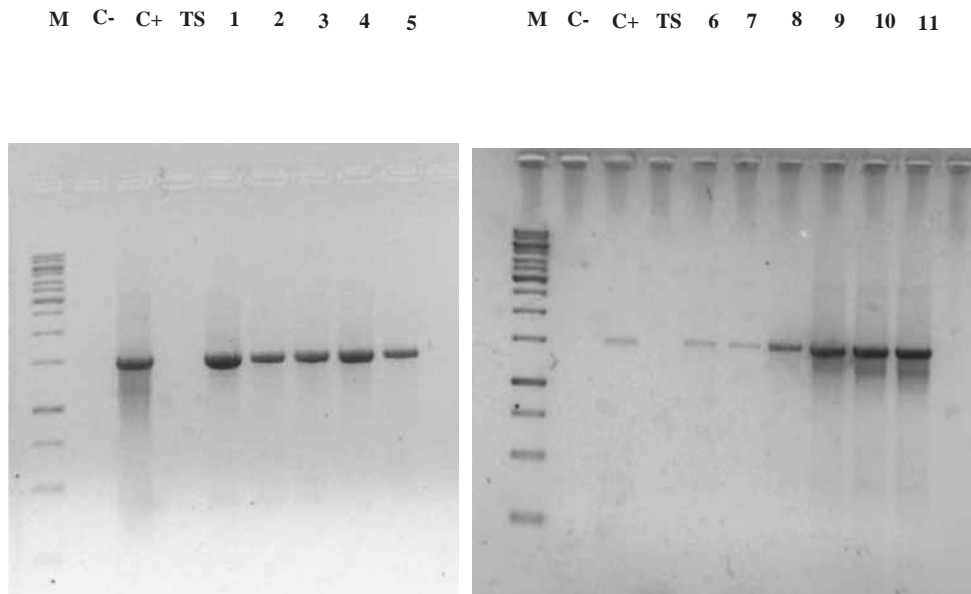


**Figura 11.** Etapas de transformação de tabaco. A) plantas de tabaco selvagem *in vitro*. B) discos foliares de tabaco em regeneração pós-infecção com *A. tumefaciens* contendo o cassete Aqua. C) Calos regenerados de tabaco transformado com o cassete Aqua. D) Brotos em enraizamento de tabaco transformado com o cassete Aqua.

#### 4.6. Análise molecular das linhagens de plantas transformadas

Foram regeneradas 11 linhagens de plantas transformadas com o cassete Aqua, as quais foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação. Para caracterização molecular destas linhagens, procedeu-se a extração de DNA genômico das folhas, e uma amplificação por PCR usando oligos que flanqueiam a região promotora foi empreendida. Conforme indicado na Figura 11, a presença de produto de amplificação de tamanho esperado confirma a inserção do cassete de expressão nas linhagens transgênicas analisadas.





**Figura 12.** Confirmação da inserção do cassete de expressão Aqua nas linhagens transformadas de tabaco. M - GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); TS - DNA de tabaco selvagem não transformado; 1 a 11 – linhagens transgênicas obtidas. Gel de agarose 1% corado com Brometo de etídio.

#### 4.7. Ensaios histoquímicos da atividade GUS em tabaco

Com a disponibilidade das sementes da geração T1 foi possível realizar o ensaio histoquímico de GUS em plântulas recém germinadas. Nesse experimento foi usado como controle negativo, plântulas de tabaco selvagem SR1, e como controle positivo, plântulas contendo o cassete de expressão 35S CaMV-GUS. As linhagens transgênicas contendo o cassete Aqua apresentaram padrão de expressão de GUS em região intermediária entre a parte aérea e a radicular, uma vez que essas estão num estágio inicial do desenvolvimento onde ainda não há uma divisão clara entre epicotilo e hipocotilo (Figura 13), mas não apresenta expressão em folhas.

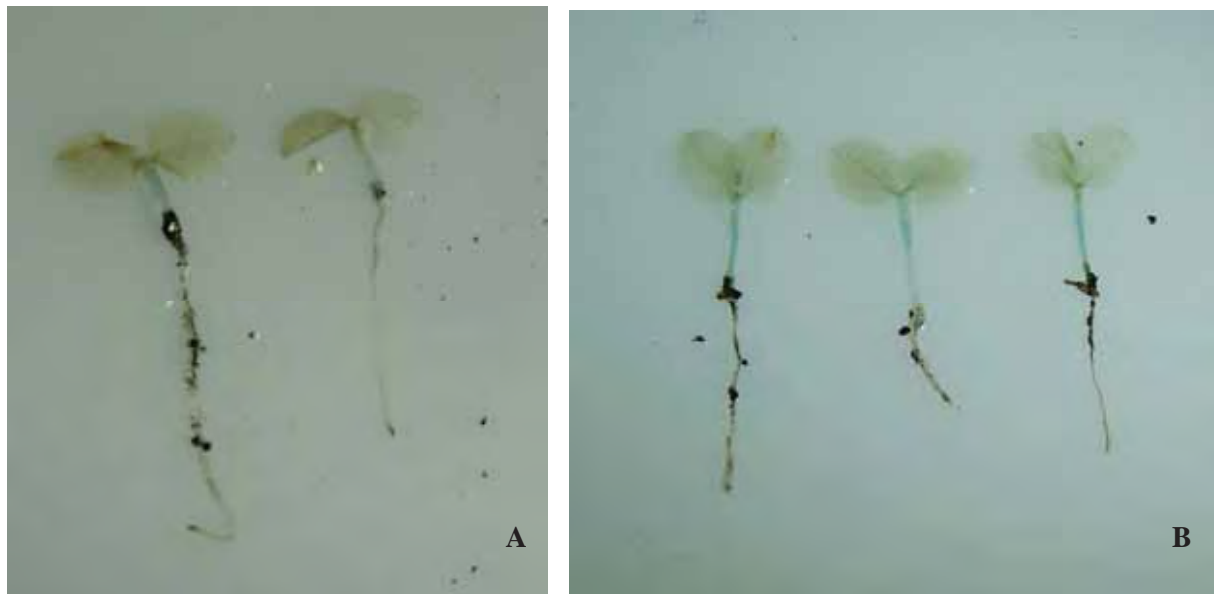


Figura 13. Padrão de Expressão do cassete Aqua1 em plântulas de tabaco transformado com 9 dias após germinação. A) Plântulas de tabaco transgênico linhagem Aqua1:11 B) Plântulas de tabaco transgênico linhagem Aqua1:8.

## 5. CONCLUSÕES

O promotor do gene que codifica uma aquaporina de eucalipto foi clonado e sequenciado, e um cassete de expressão contendo o referido promotor em fusão com o gene repórter GUS foi obtido. Linhagens transgênicas de tabaco contendo esse cassete de expressão foram regeneradas e estudos funcionais foram empreendidos empregando plantas da geração T1

Como demonstrado nos ensaios GUS, o promotor AQUA1 consegue modular a transcrição do gene repórter GUS em região intermefiaria entre o hypocotilo e o epicotilo de plântulas de tabaco transgênicas, mas não apresenta nenhuma expressão em folha como esperado. Deste modo, Esse resultado indica uma possibilidade da presença de elementos *cis*-regulatórios necessários para dirigir preferencialmente a expressão gênica em raiz nessa sequencia. Contudo é necessario maiores análises em diferentes estagios de desenvolvimento dessas plantas transgênicas para uma analise de expressão mais ampla que garantirá uma maior confiabilidade da localização da expressão desse gene, bem como seu padrão de expressão durante seu desenvolvimento.

## CAPITULO 2

### 1) INTRODUÇÃO

#### 1.1 Origem das Famílias Gênicas

No curso da história evolutiva, o gene e suas regiões regulatórias sofrem uma variedade de modificações, incluindo substituições nucleotídicas, duplicações, recombinações e eventos de reparo (Liberles, 2001). Existem vários tipos de duplicação gênica, que se classificam conforme a extensão da região genômica envolvida. Segundo Thompson (2006), a duplicação gênica completa produz duas cópias idênticas e estas sequências podem evoluir de diferentes formas: uma das cópias pode originar um pseudogene por apresentar mutações deletérias (pseudofuncionalização); ou ambas podem ser repetidas. A preservação pode levar à persistência das duas cópias com similaridade de sequência, à subfuncionalização (onde cada cópia adota algumas das características do ancestral) ou à neofuncionalização (quando um gene mantém a função original, enquanto o outro adquire uma nova função) (Gonzalez-Duarte & Albalat, 2005). Assim a duplicação gênica pode dar origem a novidades genéticas, produzindo novos genes.

A redundância do material genético é uma das mais peculiares características de todos os genômas, sendo que esta aumenta com o tamanho e a complexidade do genoma (Santamaria *et al.*, 2004). Em regiões codificadoras, os genes podem ser duplicados ou retrotranspostos criando genes parálogos que se agrupam em famílias. Genes que possuem a mesma origem são chamados de homólogos, podendo ser classificados em ortólogos, se sua divergência é devido à especiação, ou parálogos, se eles se originaram da duplicação gênica. Alguns parálogos podem manter a mesma função que o gene ancestral, enquanto outros podem adquirir novas funções (Doyle & Gaut, 2000). Assim, a redundância gênica é um importante mecanismo na evolução, podendo criar inovações. Neste cenário, o entendimento das funções específicas de cada membro de uma família gênica, bem como a comparação das mesmas entre as várias espécies, constitui um problema altamente relevante (Santamaria *et al.*, 2004).

A duplicação de genes em genomas de eucariotos leva a formação de famílias gênicas com número e tamanho variáveis de membros, os quais podem adquirir funções no espaço (diferentes tecidos, células ou

organelas) e no tempo (diferentes estágios do desenvolvimento) (Wagner, 2002). A homologia de sequências entre membros de uma mesma família multigênica depende principalmente de taxas relativas de ocorrência de mutações e eventos ilegítimos de crossing-over, além de ser influenciada em alguma extensão pela seleção natural e deriva genética (Wagner, 2002; ohta, 2003). Além disso, genes pertencentes às famílias multigênicas estão, usualmente, sob o mesmo controle regulatório. Portanto, é interessante estudar como diferentes padrões de expressão são adquiridos.

Muitos genes nucleares são membros de famílias multigênicas, sendo que a formação dessas famílias deve ter sido fundamental na evolução de plantas. A recorrência de duplicação e a divergência funcional têm gerado as famílias gênicas atuais. Vários estudos têm sido conduzidos a fim de avaliar a dinâmica evolutiva das famílias gênicas em plantas, incluindo aqueles que codificam proteínas regulatórias, proteínas de choque térmico e as proteínas de ligação á clorofila a e b, entre outras. A maioria dessas famílias possui diversos loci e apresenta uma grande variação no número de cópias entre as espécies. As famílias gênicas em plantas variam de pequenas famílias com poucos loci, como muitas enzimas metabólicas das famílias ADH e RBCS, a grandes famílias com centenas de loci, como as proteínas de choque térmico. Análises filogenéticas indicam que muitas dessas variações podem ser atribuídas à duplicação recente. Assim, a dinâmica evolutiva dessas famílias apresenta flutuações no número de cópias através de eventos múltiplos de duplicação e deleção (Morton et al., 1996). No entanto, os processos evolutivos que controlam a estrutura dinâmica da tais famílias são relativamente pouco compreendidos (Small e Wendel, 2000a ).

## **1.2 Família Gênica das Aquaporinas**

As aquaporinas foram primeiramente identificadas como proteínas de canal de água e apresentam, nestes aspectos, uma notável eficiência no transporte. Aquaporinas têm também uma seletividade iônica rigorosa, e são, em particular, totalmente impermeáveis a prótons. Algumas aquaporinas também podem ser permeadas por pequenos solutos neutros ou por gases interferindo nas respostas fisiológicas em plantas .

Até agora, um corpo substancial de evidências mostra que aquaporinas em plantas estão envolvidas na captação de água pelas raízes (Javot *et al.*, 2003, Siefritz *et al.*, 2002), reprodução (Bots *et al.*, 2005), o

alongamento das células (Hukin *et al.*, 2002), fotossíntese e germinação das sementes (Vander Willigen *et al.*, 2006). Essas proteínas têm atraído a atenção de biólogos, inicialmente devido a sua abundância no plasma e membranas intracelulares de células vegetais e, posteriormente, devido as suas propriedades únicas de transporte de águas e soluto. A aquaporina (AQPS) é uma proteína integral de membrana que facilita o transporte de pequenas moléculas, como água e glicerol, ou substâncias voláteis como o CO<sub>2</sub> ou NH<sub>3</sub> (Nakhoul *et al.* 1998, 2001, Biela *et al.* 1999, Uehlein *et al.* , 2003). Além disso, a atividade de transporte intrínseca das aquaporinas é regulada pelo seu estado de fosforilação e os parâmetros celulares, incluindo prótons citosólica (H) e cálcio (CA<sub>2</sub>).

As aquaporinas em plantas são mais abundantes e apresentam maior diversidade do que nos animais ou bactérias. Estas pertencem à família de proteínas MIP (major intrinsic protein). São proteínas altamente hidrofóbicas que apresentam seis domínios transmembrana e massas moleculares de 26 a 34 kDa. O sequenciamento dos genomas de *Arabidopsis* e arroz estabeleceu o número dos genes da aquaporina como sendo: 35 em *Arabidopsis* (Johanson *et al.*, 2001, Quigley *et al.*, 2001) e 33 em arroz (Sakurai *et al.*, 2005). Além disso, projetos de sequenciamento de etiquetas de seqüência expressa (EST) permitiram a identificação de 36 isoformas de aquaporinas em milho (Chaumont *et al.*, 2001), enquanto que 28 são evidente no genoma de uva (Fouquet *et al.*, 2008). Além disso, um total de 55 genes de MIPs foi identificado em *Populus*, sendo este o maior número de genes identificado em uma única espécie até a presente data (Gupta & Sankararamkrishnan, 2009).

A estrutura principal, o substrato de transporte, a regulação funcional, o perfil de expressão gênica, bem como a abundância e localização intracelular das aquaporinas são altamente diversificados (Maeshima & Ishikawa, 2008). Com base na homologia de seqüência, as aquaporinas de plantas superiores formam quatro subfamílias, que correspondem à suas diferentes localizações sub-celulares (Figura 1) (Johanson *et al.*, 2001, Quigley *et al.*, 2001, Chaumont *et al.*, 2001): proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs) e proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs), que juntas representam vias centrais transcelular e intracelular de transporte de água (Maurel *et al.*, 2002, Wallace *et al.*, 2006); proteínas intrínsecas como nodulin 26 (NIPs), abundante na membrana peribacteróides de fixação simbiótica de nitrogênio em nódulos de raízes de soja (Wallace *et al.*, 2006); e pequenas proteínas intrínsecas básicas (SIPs) (Johanson & Gustavsson, 2002), que são, na sua maioria, localizadas no retículo endoplasmático (ER) (Ishikawa *et al.*, 2005).

As TIPs participam do fluxo de água e de pequenos solutos em toda a membrana vacuolar (tonoplasto), podendo desempenhar um papel central na osmorregulação celular (Maurel *et al.* . 1997; Tyerman *et al.* , 1999). Segundo estudos de Gerbeau e colaboradores (1999), além de seu papel como canal de água, algumas TIPs podem desempenhar um papel importante no equilíbrio das concentrações de uréia entre o vacúolo e o citoplasma. Além disso, elas podem estar envolvidas na desintoxicação do citoplasma por um mecanismo de armadilha ácida, que facilita o transporte de amônia, como sugerido por Loque *et al.* (1999). Existem cinco grandes grupos na subfamília das TIP: TIP1 (nome anterior, TIP- $\gamma$ ), TIP2 ( $\delta$  TIP), e TIP3 (TIP- $\alpha$ ), além TIP4 e TIP5 (fig. 1). Os membros dos grupos TIP1, TIP2 e TIP4 têm sido localizados nas membranas de vacúolos centrais, enquanto que os membros do grupo TIP3 estão localizados na proteína corporal, que é um derivado da organela vacuolar (Jiang *et al.*, 2001, Maeshima *et al.*, 1994, Maeshima, 2001). Os membros da subfamília TIP têm especificidades próprias de substratos, incluindo água, amônia (membros TIP2), uréia (membros da TIP1, TIP2 e TIP4 grupos) e glicerol (TIP tabaco) (Maeshima & Ishikawa, 2008).

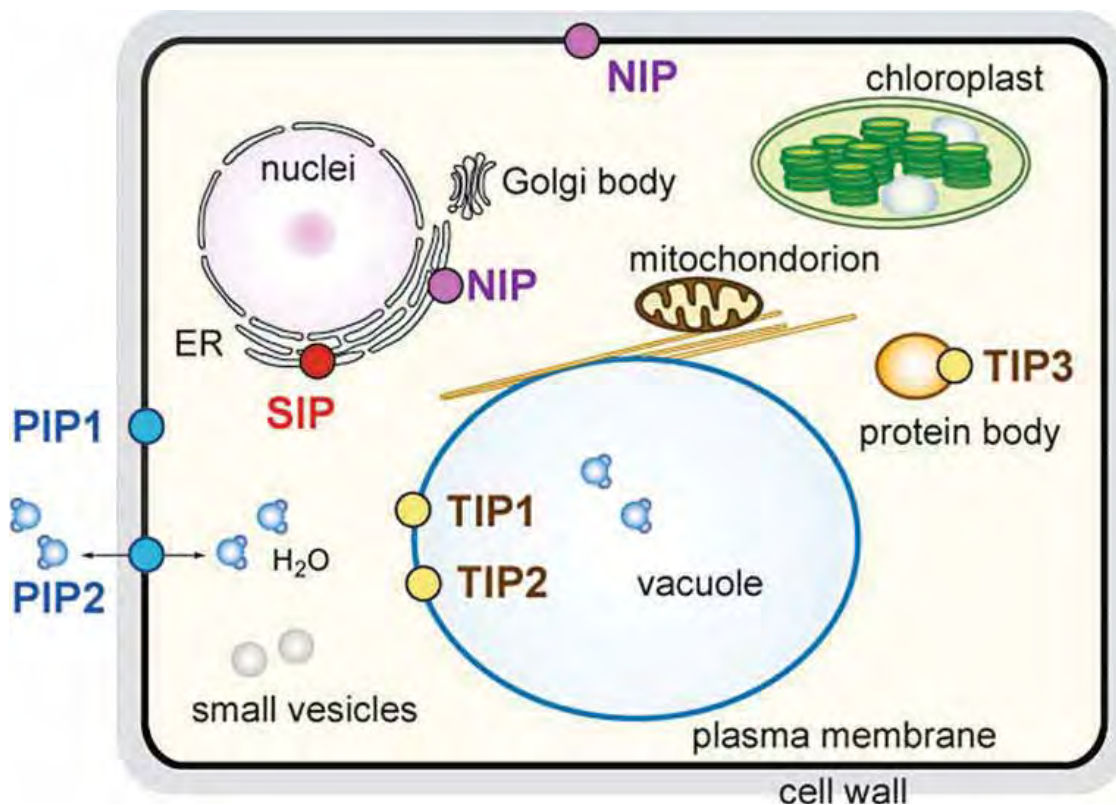


Figura 14. Diagrama esquemático da localização das subfamílias de aquaporinas em planta. PIPs são localizados na membrana plasmática, TIPs na membrana vacuolar e na membrana de uma proteína corporal, SIP na membrana do retículo endoplasmático (ER), e NIP na membrana plasmática e ER (Maeshima & Ishikawa, 2008).

As NIPs são transportadores multifuncionais e sua função sugerida é a de mediar o fluxo bidirecional de água, glicerol, NH<sub>3</sub> e outros pequenos solutos entre o citoplasma de plantas e bacteróides simbióntes (Kaldenhoff. & Fischer, 2006). Entretanto, quando comparado com as demais aquaporinas, as NIPs têm uma menor taxa de transporte de água. Transcritos de gene NIP de que planta ??? foram encontrados na parte aérea do tegumento, e da raiz, enquanto NOD-26 é expresso apenas em nódulos (Weig, & Jakob, 2000, Schuurmans *et al.*, 2003, Weig *et al.*, 1997, Liu, *et al.*, 1994). Em modelagem por homologia foi evidenciado que os nove genes que codificam NIP em *A. thaliana* estão organizados em dois grupos: NIP I (NIP1; 1, NIP1, 2, NIP2; 1, NIP3; 1, NIP4; 1, NIP4, 2), e NIP II (NIP5; 1, NIP6; 1, NIP7; 1) (Wallace & Roberts , 2004).

A subfamília das SIPs (pequena proteína intrínseca básica) é a menor dentre as MIP de plantas. A principal razão para sua pequena dimensão é a presença de uma região N-terminal citosólica muito curta em comparação com as outras MIP de plantas (Kaldenhoff. & Fischer, 2006). Pouco se sabe sobre as SIPs, mas algumas análises de seus perfis de expressão em plantas revelou a existência de expressão tecido-específica (Ishikawa *et al.*, 2005), o que parece indicar diferentes funções de acordo com a localização (Maeshima & Ishikawa, 2008).

Já as PIPS são proteínas intrínsecas de membrana plasmática que constituem a maior subfamília de aquaporina de plantas com 13 membros em *Arabidopsis* e 14 em milho (Johanson *et al.*, 2001, Chaumont *et al.*, 2000). Como a nomenclatura indica, a maioria das PIPs está localizada na membrana plasmática (Schaffner, 1998). A subfamília PIP pode ser dividida em dois grupos filogenéticos, nomeados PIP1 E PIP2. Estes diferem pelo comprimento de suas porções N e C-terminais, e em outras características, como permeabilidade à água. As aquaporinas do tipo PIP2 geralmente têm maior permeabilidade à água do que as do tipo PIP1 (Kaldenhoff. & Fischer, 2006).

A atividade de canal de água, cuja permeabilidade pode ser considerada alta ou apenas residual, foi revelada para todos os membros de todas as quatro subfamílias das aquaporinas de planta (Takano *et al.*, 2006, Ishikawa *et al.*, 2005, Biela *et al.*, 1999, Dean *et al.*, 1999, Gerbeau *et al.*, 1999). Portanto, o uso do nome genérico aquaporina parece ser justificado para todos os homólogos presentes em planta. Devido a elevada

plasticidade genômica, as aquaporinas dificilmente se distinguem entre as espécies vegetais (Johanson *et al.*, 2001, Sakurai *et al.*, 2005, Chaumont *et al.*, 2001). No entanto, eventos genéticos podem ter ocorrido recentemente durante a evolução. Sendo assim, faz-se necessário uma maior investigação sobre os eventos que proporcionaram essas especificidades. Apesar do grande número de estudos envolvendo a família gênica das Aquaporinas, não há muitos estudos abrangentes correlacionando evolução molecular dessas proteínas em planta, mais especificamente em Eucalipto.



## **2)OBJETIVO**

Buscando entender o processo de diversificação funcional e classificar corretamente o gene de uma aquaporina identificada no banco de EST de eucalipto, o objetivo geral capítulo foi o de estudar a diversificação funcional desse gene dentro da família gênica das Aquaporinas, uma vez que esse foi provisoriamente classificado dentro de uma das subfamílias constituintes da grande família gênica das MIPs.

### 3) MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 Banco de Dados

Os bancos de dados usados como fonte para obtenção das sequências protéicas e de nucleotídeos foram: GenBank do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) para as sequências de *Arabidopsis*, milho e uva, o *Joint Genome Institute* (JGI) para buscar as sequências de *Populus*. Todas as sequências foram obtidas no formato FASTA. As descrições e autores referenciados para as famílias gênicas obtidas nos artigos durante as revisões bibliográficas foram usados como palavras-chave para as buscas.

Foram selecionadas um total de 64 sequências, 11 sequências de TIPs de milho (*Zea mays*; Chaumont *et al.*, 2001), 11 sequências de TIPs de uva (*Vitis vinifera*; Sheldon *et al.*, 2009), 17 sequências de TIPs de *Populus* (*Populus trichocarpa*; Gupta & Sankararamakrishnan, 2009) e 10 sequências de TIPs de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Johanson *et al.*, 2001). Adicionalmente, 25 sequências de *Arabidopsis* compreendendo PIPs, NIPs e SIPs foram usadas. As sequências de *Arabidopsis* foram inicialmente utilizadas para classificação do gene de aquaporina de eucalipto, e posteriormente, as demais sequências de outras espécies de angiospermas foram utilizadas para análise de filogenética evolutiva comparada.

#### 2.2 Alinhamento das Sequências geradas e Análise Filogenética

As sequências foram alinhadas através do programa CLUSTAL W (Jeanmougin, 1998). Os arquivos obtidos foram então transferidos para o formato MEG para que os dados neles contidos pudessem ser usados no programa MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

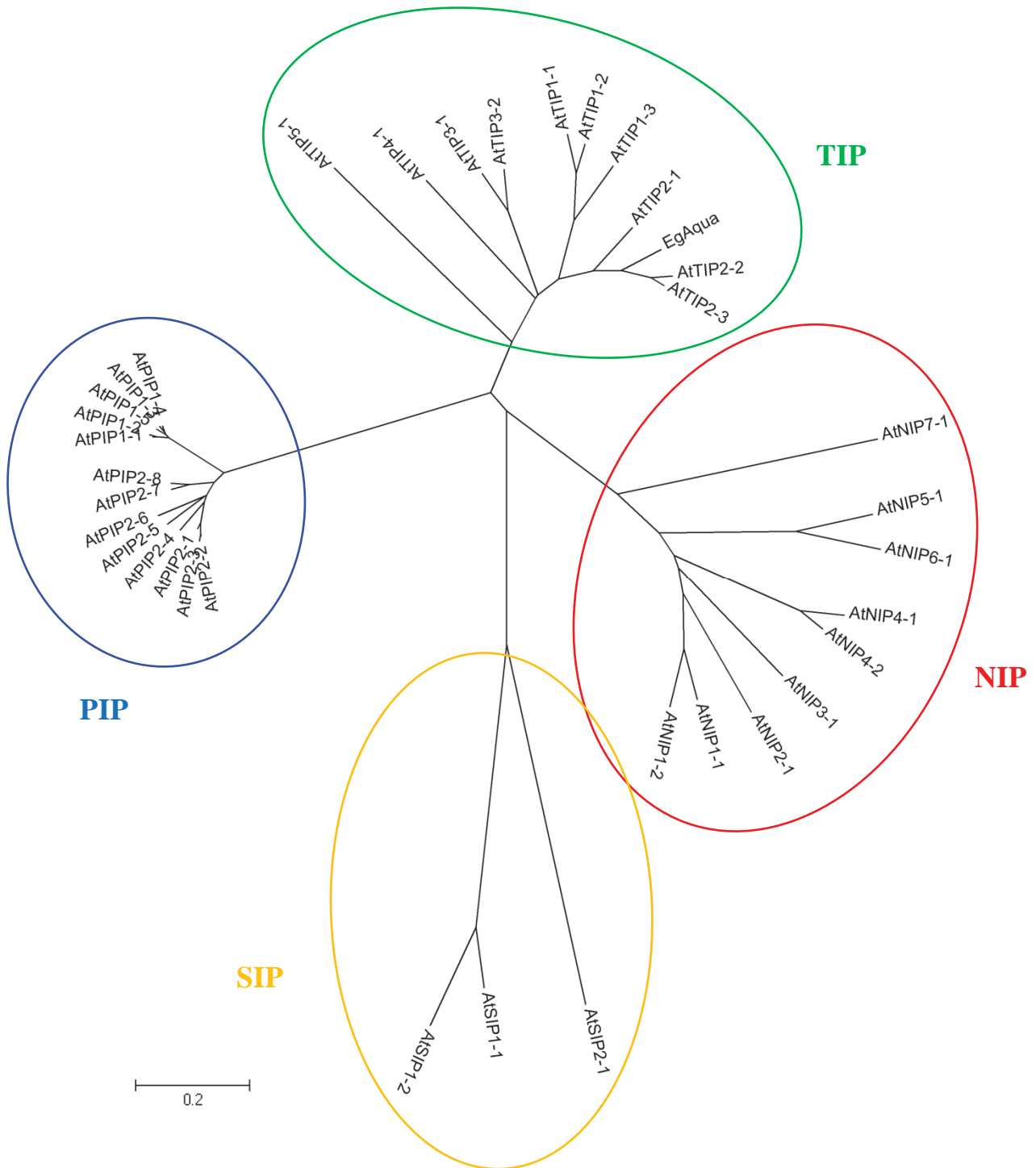
As filogenias foram estimadas para cada subfamília gênica empregando as sequências protéicas alinhadas e utilizando o método de *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1984), que é o método de preferência quando as taxas evolutivas variam entre os ramos da árvore filogenética (Nei, 1991; Heighs, 2001). As análises no MEGA4 foram realizadas em duas etapas. Na primeira etapa foi estabelecida uma árvore filogenética comparando a Aquaporina de eucalipto em estudo com 35 aquaporinas identificadas em *Arabidopsis*. Na segunda etapa, uma segunda árvore foi gerada usando sequências de aquaporinas de

monocotiledôneas e dicotiledôneas juntamente com a aquaporina de eucalipto. Em todas as análises foram utilizadas 1000 reamostragens (bootstrap).

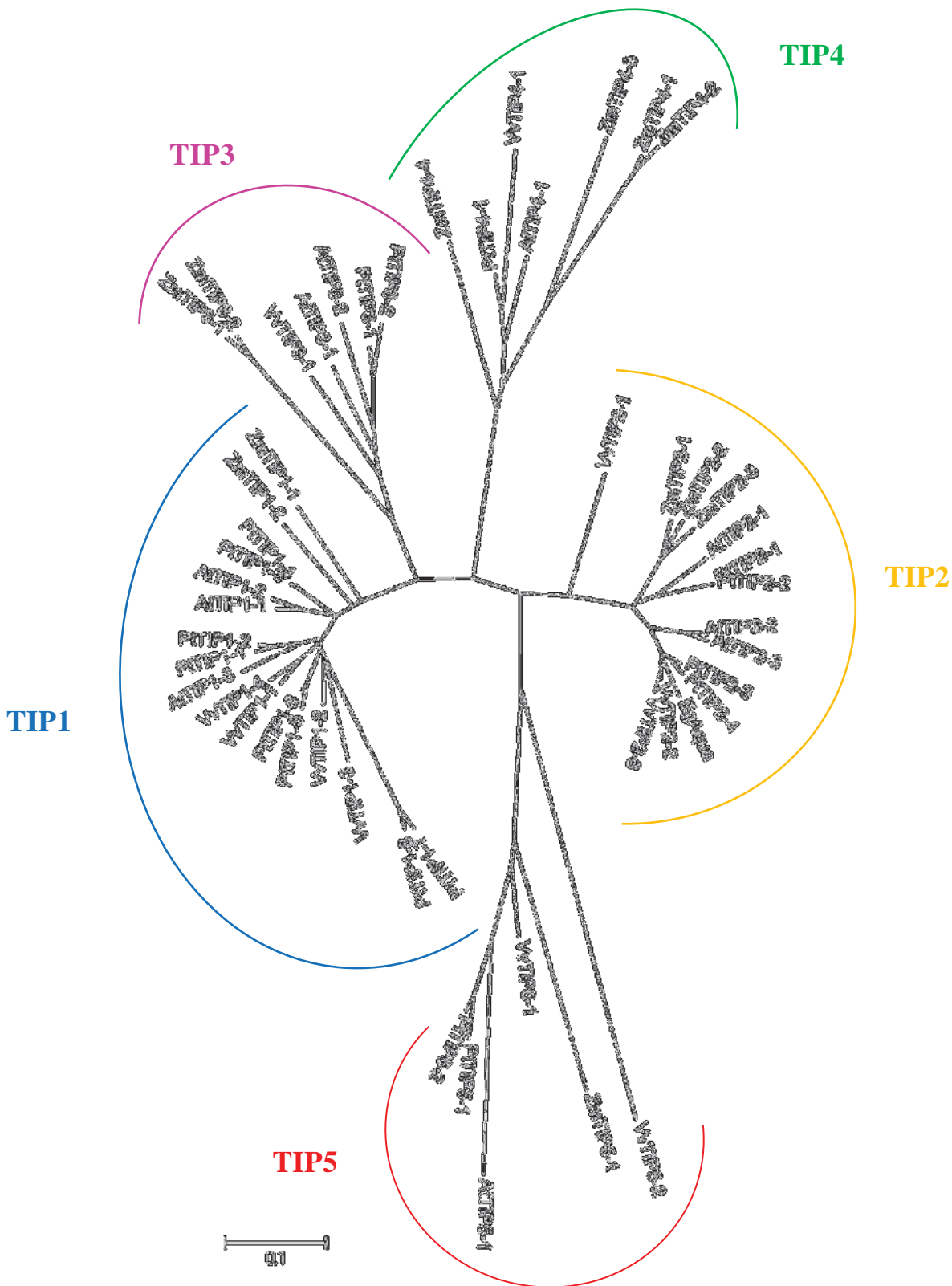
A análise filogenética foi também realizada usando o método UPGMA, que é um algoritmo fenético baseado em distâncias genéticas que considera a similaridade geral no agrupamento das OTUs.

### 3) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A árvore filogenética comparativa (Figura 2) entre as sequências de aquaporinas de *Arabidopsis* pertencentes às quatro diferentes subfamílias conhecidas (PIP, TIP, NIP e SIP) e o gene de eucalipto (denominado EgAqua), confirmou que este pertence à subfamília das TIPs. Na figura 2 é possível observar que a sequência de eucalipto se agrupou junto a outras TIPs de *Arabidopsis*, mais especificamente entre as TIPs 2. Esse resultado era esperado uma vez que o gene de aquaporina de milho utilizado na busca do EST de eucalipto no banco FORESTs é uma TIP 2 (Lopez *et al.*, 2004).



**Figura 15.** Árvore filogenética construída a partir das seqüências de aminoácidos de aquaporinas das subfamílias TIP (*tonoplast intrinsic proteins*), PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*), NIP (*Nod26-like intrinsic proteins*) e SIP (*small and basic intrinsic proteins*) de *Arabidopsis thaliana* em comparação com a aquaporina de *Eucalyptus grandis* em estudo. A análise foi realizada utilizando Neighbor-Joining, com 1000 réplicas de bootstrap.



**Figura 16.** Árvore filogenética construída a partir de sequências de aminoácidos de aquaporinas da subfamília TIP( tonoplast intrinsic proteins) de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* e a sequência em estudo proveniente de *Eucalyptus grandis*. Análise realizada uando Neighbor-Joining, com 1000 réplicas de bootstrap.

Com relação aos alinhamentos usando somente sequências da subfamília das TIPs de diferentes espécies vegetais (Figura 3), foi possível confirmar que a aquaporina de eucalipto faz efetivamente parte da subfamília das TIPs, estando muito próxima das isoformas TIP 2: 2.2 e 2.3. Destaca-se também a proximidade da aquaporina de eucalipto com as aquaporinas de uva, seguida pela de *Populus*, o que demonstra, como era esperado, uma divergência maior desse gene com as espécies de monocotiledôneas.

#### 4) CONCLUSÕES

As análises filogenéticas conduzidas nesse trabalho permitem sugerir as seguintes conclusões:

- A aquaporina de eucalipto pertence à subfamília das TIPs.
- A topologia da árvore indicou que as duplicações gênicas ocorreram em vários níveis dentro da árvore, ou seja, várias vezes durante a evolução.

## 6) ANEXOS

### 6.1 Tampão CTAB estoque (50 ml) – Extração de DNA:

2% CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 1% PVP (polyvinylpyrrolidone K 40), 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2 % 2-mercaptoetanol (adicionar somente na hora do uso) e completar com água Milli-Q.

### 6.2 Ciclagem de PCR utilizada na técnica do *Genome Walking*:

Termociclador utilizado – Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 sendo que o PCR primário consistiu de:

- 7 ciclos: 94oC - 2 sec

72oC - 3 min

- 32 ciclos: 94oC - 2 sec

67oC - 3 min

- 67°C por mais 4 min.

O PCR secundário foi realizado por:

- 5 ciclos: 94°C - 2 sec

72°C - 3 min

- 20 ciclos: 94°C - 2 sec

67°C - 3 min

- 67°C por mais 4 min.

### **6.3 Mini-preparação de plasmídeos por lise alcalina**

Referência: Kit Colunas Qiagen, modificado

- 1) Inocular uma colônia isolada em 3 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado. Após incubação durante toda a noite a 37°C, transferir aproximadamente 1,4 ml para o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2) Centrifugar a 14000 rpm durante 60 s, descartar o sobrenadante. Adicionar outros 1,4 ml da cultura de bactérias e centrifugar outros 60s. Ressuspender as bactérias em 300 µl de P1 utilizando vortex.
- 3) Adicionar 300 µl de P2. Agitar por inversão suave do tubo e incubar à temperatura ambiente durante 5 min. Não prolongar este período em excesso.
- 4) Adicionar 300 µl de P3. É importante agitar cada tubo por inversão suave logo após a adição de P3. Nesta etapa deve ser formado um precipitado branco.
- 5) Incubar as amostras no gelo por 20 min.
- 6) Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min e coletar com cuidado 700 a 800 µl do sobrenadante para um novo tubo. Evitar a coleta do precipitado que se forma na superfície da solução.
- 7) Centrifugar, se necessário, por 15 min novamente as amostras e coletar 650 a 750 µl do sobrenadante para um novo tubo.
- 8) Adicionar 400 µl de isopropanol e incubar a -20°C por 1 hora.



9) Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente.

10) Descartar o sobrenadante, adicionar 700 µl de etanol 70%, inverter o tubo com cuidado e centrifugar a 14000 rpm durante 5 min.

11) Descartar o etanol, secar completamente o DNA e ressuspender em 30 µl de água deionizada autoclavada.

Soluções:

P1) Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM, EDTA (pH 8.0) 10 mM e RNase 100 µg/ml. Estocar a 4°C uma vez adicionada a RNase)

P2) NaOH 200 mM, SDS 1%

P3) Acetato de potássio 3M, ajustar o pH para 5.5 com ácido acético glacial.

Armazenar a 4°C.

#### **6.4 Mix da reação de sequenciamento:**

MIX Volume (µl)

Save Money 2.0

Big Dye v.3.1 1.5

DNA molde 350 ng

Oligo 1.0 (0.5 uM)

H2O completar para 10.0

Volume total 10.0

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF, A849a **Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009/ ABRAF.** – Brasília,

140p. Brasília, 2010.

AHARON, R., SHAHAK, Y., WININGER, S., BENDOV, R., KAPULNIK, Y., GALILI, G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. **The Plant Cell**, v.15, p.439–447, 2003.

ALTPETER, F., VARSHNEY, A., ABDERHALDEN, O., DOUCHKOV, D., SAUTTER, C., KUMLEHN, J., DUDLER, R., SCHWEIZER, P. Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. **Plant Molecular Biology**, v.57, p.271–283, 2005.

AROCA, R., AMODEO, G., FERNANDEZ-ILLESCAS, S., HERMAN, E.M., CHAUMONT, F., CHRISPEELS, M.J. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. **Plant Physiol** 137: 341–353, 2005.

BIELA, A., GROTE, K., OTTO, B., HOTH, S., HEDRICH, R. & KALDENHOFF, R. The Nicotiana tabacum plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. **Plant J** 18, 565–570, 1999.

BOTS, M., VERGELDT, F., WOLTERS-ARTS, M., WETERINGS, K., VAN AS, H. AND MARIANI, C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. **Plant Physiol.** 137, 1049–1056, 2005.

BRANDALISE, M. Isolamento e caracterização de promotores tecido específico de raiz e folha de *Coffea arabica*. **Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista**, Botucatu. 141f.2007.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. DE C. Manual de transformação genética de plantas  
embrapa. Brasília embrapa-SPI/ **Embrapa-cenargen**, 114p., 1998.

CHAUMONT, F., BARRIEU, F., WOJCIK, E., CHRISPEELS, M.J. AND JUNG, R. Aquaporins constitute  
a large and highly divergent protein family in maize. **Plant Physiol.** 125, 1206–1215, 2001.

CHAUMONT, F., BARRIEU, F., JUNG, R., CHRISPEELS, M.J. Plasma membrane intrinsic proteins from  
maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity, **Plant Physiol.** 122 :1025–  
1034, 2000.

DEAN, R.M., RIVERS, R.L., ZEIDEL, M.L. AND ROBERTS, D.M. Purification and functional  
reconstitution of soybean Nodulin 26. An aquaporin with water and glycerol transport properties.  
**Biochemistry** 38, 347–353, 1999.

DOSSA, D., SILVA, H. D., BELLOTE, A.F. J., RODIGHERI, H. R. Produção e Rentabilidade do Eucalipto  
em Empresas Florestais. Comunicado técnico 83. Colombo, PR. **EMBRAPA**. 4p. 2002.

DOYLE, J. J. & GAUT, B. S. Evolution of genes and taxa: a primer. **Plant Molecular Biology**, 42: 1-23.  
2000.

FERREIRA E. M., GRATTAPAGLIA D. Extração de DNA genômico total de plantas. Em:  
Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa**, 3ª ed., p.121-139,  
1998.

FOUQUET, R., LE'ON, C., OLLAT, N., BARRIEU, F. Identification of grapevine aquaporins and  
expression analysis in developing berries. **Plant Cell Rep** 27: 1541–1550, 2008.

GERBEAU, P., GUCLU, J., P. RIPOCHE, MAUREL, C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high  
permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes, **Plant J.** 18 577–587, 1999.

GONÇALVES, J.L.M. & BENEDETTI, V. Nutrição e fertilização florestal. Piracicaba. **IPEF**, 427p., 2000.

GONZALEZ- DUARTE, R. & ALBALAT, R. Merging protein, gene and genomic data: the evolution of the  
MDR-ADH family. **Heredity** 95: 184-197. 2005.

GOMES,D., AGASSE, A., THIÉBAUD, P., DELROT, S., GERÓS, H., FCHAUMONT, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **BBAMEM-79938**, nº of pages:16; 4C, 2009.

GUENTHER, J.F., CHANMANIVONE, N., GALETOVIC, M.P., WALLACE, I.S., COBB, J.A., ROBERTS, D.M. Phosphorylation of soybean nodulin 26 on serine 262 enhances water permeability and is regulated developmentally and by osmotic signals. **Plant Cell** 15: 981–991, 2003.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

HEYMANN, J.B., ENGEL, A. Aquaporins: phylogeny, structure, and physiology of 1177 water channels. **News. Physiol. Sci.**, v.14, p.187–193, 1999.

HIGO, K., UGAWA, Y., IWAMOTO, M., KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. **Nucleic Acids Res**, v.27, p.297-300, 1999.

HOSHINO, A. A. Isolamento e Caracterização de Promotores Tecido-específicos a partir das Informações do SUCEST (“Sugarcane Expressed Sequence Tags”). **Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista**, Botucatu. 143f, 2007.

HUKIN, D., DOERING-SAAD, C., THOMAS, C.R. AND PRITCHARD, J. Sensitivity of cell hydraulic conductivity to mercury is coincident with symplasmic isolation and expression of plasmalemma aquaporin genes in growing maize roots. **Planta** 215, 1047–1056, (2002).

ISHIKAWA, F., SUGA, S., UEMURA, T., SATO, M.H. AND MAESHIMA, M. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett.** 579, 5814–5820, 2005.

JANG, J.Y., KIM, D.G., KIM, Y.O., KIM, J.S., KANG, H.S. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol** 54: 713–725, 2004.

- JAVOT, H. Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. **Plant Cell** 15, 509–522. 2003.
- JIANG, L., PHILLIPS, T.E., HAMM, C.A., DROZDOWICZ, Y.M., REA, P.A., MAESHIMA, M., ROGERS, S.W., ROGERS, J.C. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. **J Biol Chem** 155:991–1002, 2001.
- JOHANSON, U., KARLSSON, M., JOHANSSON, I., GUSTAVSSON, S., SJOVALL, S, L. FRAYSSE, WEIG, A.R., KJELLBOM, P, The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants, **Plant Physiol.** 126 1358–1369, 2001.
- JOHANSON, U., GUSTAVSSON S. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants, **Mol. Biol. Evol.** 19:456–461, 2002.
- KALDENHOFF, R., GROTE, K., ZHU, J.J., ZIMMERMANN, U. Significance of plasmalemma aquaporins for water transport in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.14, p.121–128, 1998.
- KJELLBOM, P., LARSSON, C., JOHANSSON II, KARLSSON, M., JOHANSON, U.
- Aquaporins and water homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v.4, p.308-314, 1999.
- KLAR, A. E. A água no sistema solo-planta-atmosfera. São Paulo: **Nobel**, 1984. 408 p.
- KAWASAKI, S., BORCHERT, C., DEYHOLOS, M., WANG, H., BRAZILLE, S., KAWAI, K., GALBRAITH, D., BOHNERT, H.J. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. **Plant Cell** 13: 889–905, 2001.
- LIBERLES, D. A. evaluation of methods for determination of a reconstructed history of gene sequence evolution. **Molecular Biology Evolution.** 18: 2040- 2047, 2001.
- LIU, Q., UMEDA, M, UCHIMIYA, H., Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein, **Plant Mol. Biol.** 26 2003–2007, 1994.

- LOPEZ, F., BOUSSER, A., SISOEFF, I., HOARAU, J., MAHÉ, A. Characterization in maize of ZmTIP2-3, a root-specific tonoplast intrinsic protein exhibiting aquaporin activity. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.539-541, 2004.
- LOQUE, D., LUDEWIG, U., YUAN, L., VONWIREN, N., Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole, **Plant Physiol.** 137 671–680. 2005.
- LUU, D.T. & MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant Cell Environ** 28: 85–96, 2005.
- MAESHIMA M, HARA-NISHIMURA I, TAKEUCHI Y, NISHIMURA M Accumulation of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and H<sup>+</sup>-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. **Plant Physiol** 106:61–69, 1994.
- MAESHIMA, M. Tonoplast transporters: organization and function. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 52:469–497, 2001.
- MAESHIMA, M. & ISHIKAWA, F. ER membrane aquaporins in plants. **Pflügers Arch - Eur J Physiol.** v. 456, p.709–716. 2008.
- MARTINEZ-BALLESTA, M.C., MARTINEZ, V., CARVAJAL, M. Regulation of water channel activity in whole roots and in protoplasts from roots of melon plants grown under saline conditions. **Aust J Plant Physiol** 27: 685–691, 2000.
- MARTINEZ-BALLESTA, M.C., APARICIO, F., PALLAS, V., MARTINEZ, V., CARVAJAL, M. Influence of saline stress on root hydraulic conductance and PIP expression in Arabidopsis. **J Plant Physiol** 160: 689–697, 2003.
- MORTON, B. R. GAUT, B. S. AND CLEGG, M. T. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in the Palm and Grass families. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 11735- 11739. 1996.
- MAUREL, C., KADO, R.T., GUERN, J., CHRISPEELS, M.J. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin a-TIP. **EMBO J** 14: 3028–3035, 1995.

- MAUREL, C., CHRISPPEELS, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. **Plant Physiol**, v.125, p.135-138, 2001.
- MAUREL, C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. **FEBS Lett**, v.1539 581, p.2227–2236, 2007.
- MAUREL, C., SANTONI, V., LUU, D-T., WUDICK, M. M. AND VERDOUCQ, L.The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. **Plant Biology**, 12:690–698. 2009.
- MOURA, L. A. & GARCIA, C. H. **Eucalypt Cultivation in Brazil**. São Paulo-SP, 2000.
- OHTA, T. Genes families: Multigene families and Superfamilies. **Encyclopedia of the human genome**. 2003.(on-line).
- OHSHIMA, Y., IWASAKI, I., SUGA, S., MURAKAMI, M., INOUE, K., MAESHIMA, M. Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense*: comparison with radish. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.1119-1129, 2001
- QUIGLEY, F., ROSENBERG, J.M., SHACHAR-HILL, Y. AND BOHNERT, H.J. From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. **Genome Biol.** 3, 1–17.,2001.
- RIBEIRO C. L., SASSAKI F.T., SOPRANO A. S., MAIA, I. G. Molecular Characterization of a Promoter Root-Especific of *Eucalyptus*. **Anais XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2009.
- ROCKWOOD, D.L., RUDIE, A.W., RALPH, S.A., ZHU, J.Y., WINANDY, J.E. Energy product options for *Eucalyptus* species grown as short rotation woody crops. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p.1361-1378, 2008.
- SAKURAI, J., ISHIKAWA, F., YAMAGUCHI, T., UEMURA, M. AND MAESHIMA, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. **Plant Cell Physiol.** 46, 1568–1577. 2005.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p., ISBN 0-87969-309-6, 1989