

CÍNTILLA MURIEL SANTANA SOUZA

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO PROMOTOR DE UM GENE COM
EXPRESSÃO EM FOLHA DE EUCALIPTO (*Eucalyptus grandis*)**

Botucatu – SP

2011



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



**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO PROMOTOR DE UM GENE COM
EXPRESSIONÃO EM FOLHA DE EUCALIPTO (*Eucalyptus grandis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso

CÍNTILLA MURIEL SANTANA SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Souza, Cíntilla Muriel Santana.

Clonagem e caracterização do promotor de um gene com expressão em folha de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*) / Cíntilla Muriel Santana Souza. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20202008

1. Genética molecular. 2. *Eucalyptus grandis*. 3. Clonagem molecular.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Promotor; Tecido-específico.

AGRADECIMENTOS

- Ao querido Professor e orientador Dr. Ivan de Godoy Maia, primeiro como professor por fazer despertar meu interesse pela genética molecular, e depois pela orientação e dedicação durante o desenvolvimento até o término desse trabalho.
- A minha família, pelo apoio em todos os momentos em que precisei, também naqueles mais difíceis em que me encontrava preocupada e ansiosa quando as coisas não saiam como planejadas. E especialmente pelo carinho, atenção e dedicação esses anos todos, e por me tornarem quem sou hoje.
- As minhas amigas tão queridas, Ana Cláudia Lima, Fernanda Cheida, Kamila Lima, Amália Barros e Renata Miaki que mesmo longe sempre estão comigo, me trazendo alegrias, paz de espírito e força para continuar.
- Aos novos amigos que fiz aqui, Livia Amorim e Fernanda De Luca pela amizade, companheirismo, alegrias e por todos os momentos em que estiveram presentes principalmente quando precisei.
- As minhas amigas e companheiras de república que muitas vezes me aconselharam e me deram suporte.
- Aos queridos colegas do laboratório, pela paciência e ensinamentos, principalmente a pós-doutoranda Juliana Bravo a quem devo agradecimentos especiais por este trabalho.
- As minhas amigas de graduação, por tornarem esse ano tão difícil um pouco mais fácil.
- E principalmente agradeço a Deus, por estar aqui hoje e desse modo permitir que tudo isso acontecesse na minha vida.

RESUMO

Uma das principais estratégias de ação da biotecnologia na área vegetal trata da produção de plantas geneticamente modificadas com transgenes de interesse. Entretanto, para garantir a correta expressão de tais transgenes em plantas de interesse agrônômico e florestal, como é o caso do eucalipto, a identificação e caracterização de seqüências promotoras com padrões conhecidos de expressão gênica se fazem necessárias. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou clonar e sequenciar a região promotora de um gene com expressão em folha de *Eucalyptus grandis*. Em seguida, um cassete de expressão contendo o gene repórter GUS sobre controle do referido promotor foi construído e introduzido em vetor binário. O referido cassete foi então inserido em agrobactéria visando a futura transformação de plantas modelo para a realização de estudos funcionais.

SUMÁRIO

Resumo.....	04
Sumário.....	05
1. Introdução.....	07
1.1 Eucalipto.....	07
1.2 Biotecnologia e o uso de promotores.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1 Identificação e seleção do EST específico de folha.....	13
3.2 Validação da expressão do EST candidato por RT-PCR.....	13
3.3 Isolamento da região promotora, clonagem e seqüenciamento.....	15
3.4 Construção do cassete de expressão.....	16
3.5 Transformação do vetor binário em células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.6 Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes no promotor.....	18
4. Resultados e Discussão.....	19
4.1 Validação da expressão por RT-PCR do candidato.....	19
4.2 Isolamento da região promotora.....	20
4.2.1 Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes no promotor amplificado.....	20
4.3 Construção do cassete de expressão promPhosp GUS.....	21
4.4 Confirmação da transformação em <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
5. Conclusões.....	24
6. Anexos.....	25
7. Referências.....	27

LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Tabelas:

Tabela 1- Produtividade média (m ³ /ha/ano) de madeira para celulose nas espécies de Eucalipto e Pinus entre os anos de 1980 e 2009 (BRACELPA, 2010).....	08
Tabela 2- Elementos <i>cis</i> -regulatórios relevantes encontrados na análise do promotor em estudo no PLACE.....	20

Figuras:

- Figura 1- Sequência de nucleotídeos do EST EGCBLV2208C06 que faz parte do cluster EGEQLV2001G06.g. Em vermelho – códon ATG predito na região codificadora do EST.....13
- Figura 2- Representação esquemática do cassete de expressão contendo o promotor específico de folha (1500 pb) em fusão transcricional com o gene *uidA* (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z.....17
- Figura 3- Digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI* do cassete de expressão contendo o promotor específico de folha inserido em pCAMBIA 1381-z.....20
- Figura 4- PCR confirmatório da transformação do vetor binário contendo o promotor EGLV1 em *A. tumefaciens*.....20
- Figura 5- Validação da expressão tecido-específica do candidato selecionado empregando RT-PCR.....22
- Figura 6- Amplificação do gene normalizador *GAPDH* em diferentes órgãos/tecidos de eucalipto.....23

Gráfico:

- Gráfico 1- Distribuição da área de plantios de Eucalyptus por estado, 2010 (ABRAF, 2011).....09
- Gráfico 2- Crescimento percentual da área plantada com Eucalyptus por estado, 2010 (ABRAF, 2011).....09

1. INTRODUÇÃO

1.1 Eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae e originário da Austrália, foi introduzido no Brasil por volta do final do século XIX e início do século XX. O eucalipto, com destaque especial para a espécie *E. grandis*, possui crescimento acelerado no cultivo, e se adaptou muito bem ao clima e solo brasileiros (Leite, 1998).

Os eucaliptos estão entre as árvores de crescimento mais rápido e são candidatos adequados como fonte de biomassa para bioenergia e extração de polpa. No melhoramento, os objetivos têm sido principalmente obter ganhos em biomassa, fibras de qualidade, tolerância a estresses biótico e abiótico, controle da floração e resistência a herbicidas. A domesticação do gênero *Eucalyptus* encontra-se apenas em sua infância, principalmente pelo fato do melhoramento genético clássico de árvores ser dificultado pelo longo estágio juvenil, sendo que muitas características de interesse podem ser avaliadas apenas na idade de rotação (Boerjan, 2005; Lopes *et al.*, 2010).

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). O eucalipto é cultivado em diversas partes do mundo, especialmente por ser uma espécie de uso múltiplo com possibilidade de atender a diversos segmentos, principalmente os de interesse comercial, como as indústrias de papel e celulose. 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 móveis (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 (ABRAF, 2010). Entre outras utilidades, podemos incluir também a remoção de gás carbônico (CO₂) da atmosfera contribuindo para a diminuição do efeito estufa, a proteção dos solos contra processos erosivos, acrescentando a ele características de permeabilidade, aumentando a taxa de infiltração das águas pluviais e regularizando o regime hidrológico nas áreas plantadas.

No Brasil, a produtividade média das florestas de eucalipto é de 44 m³/ha/ano, sendo esse alto nível de produtividade resultante de grandes investimentos em pesquisa e desenvolvimento, clonagem de mudas, favorecidos também pelas boas condições do clima e do solo brasileiro (BRACELPA, 2010).

Tabela 1- Produtividade média (m³/ha/ano) de madeira para celulose a partir de Eucalipto e Pinus entre os anos de 1980 e 2009 (BRACELPA, 2010).

Madeira para celulose – produtividade média (m³/ha/ano)			
Espécie	1980	2009	Cresc.
Eucalipto	24	44	83%
Pinus	19	38	100%

Fonte: Bracelpa

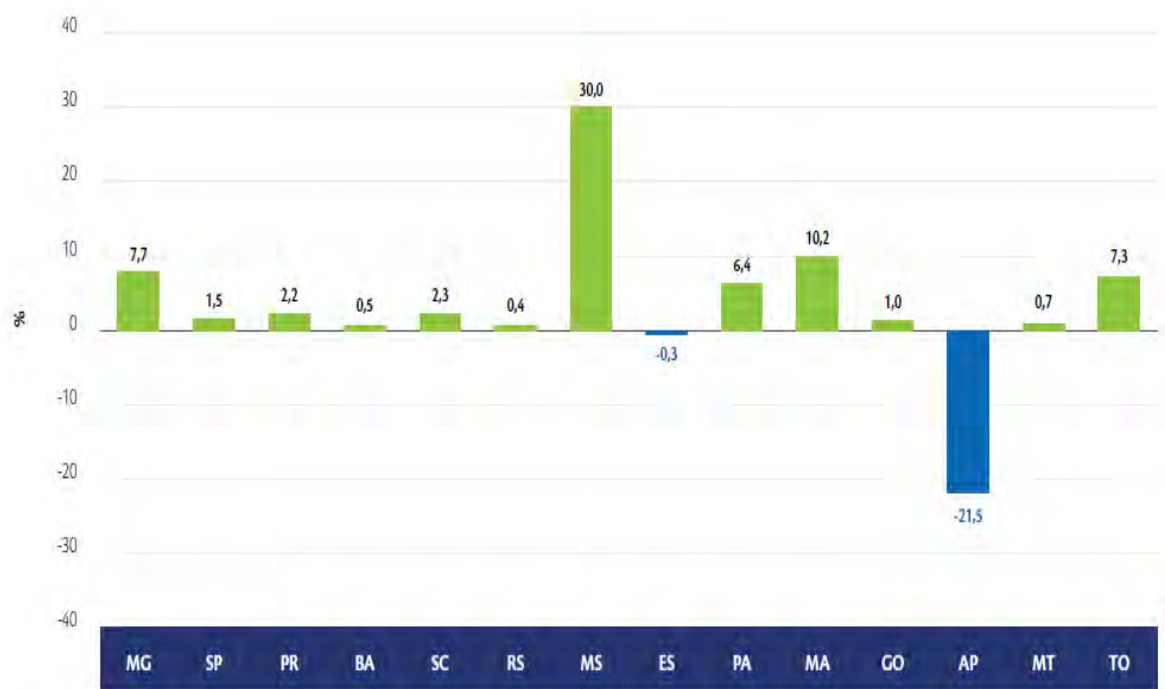
O manejo florestal sustentável, apoiado pelo desenvolvimento tecnológico e genético, é um dos pilares da competitividade global do setor nacional, que garante ao Brasil uma posição de destaque entre os principais produtores mundiais de celulose e papel. Nesse contexto, a alta produtividade e a qualidade da madeira obtidas nos últimos anos – principalmente como resultado de pesquisas de melhoramento genético e de técnicas silviculturais – são características que destacam o Brasil no cenário internacional (BRACELPA, 2010).



Fonte: Associadas individuais e coletivas da ABRAF (2011) e diversas fontes compiladas por Pöyry Silviconsult (2011).

Gráfico 1- Distribuição da área de plantios de *Eucalyptus* por estado. Dados de 2010 (ABRAF, 2011).

Os estados produtores de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e Paraná detém 86,1% dos plantios do gênero *Eucalyptus* no Brasil (Gráfico1) (ABRAF, 2011).



Fonte: Anuário ABRAF (2010), Associadas individuais e coletivas da ABRAF (2011) e diversas fontes compiladas por Pöyry Silviconsult (2011).

Gráfico 2- Crescimento percentual da área plantada com *Eucalyptus* por estado. Dados de 2010 (ABRAF, 2011).

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).

1.2 Biotecnologia e o uso de promotores

Na busca por um manejo sustentável dos agroecossistemas surgem novas abordagens, como o uso da biotecnologia, com a finalidade de aperfeiçoar o cultivo, gerando estratégias de melhoramento aplicáveis a diferentes culturas. Abordagens biotecnológicas para resistência a doenças, por exemplo, representam uma alternativa atraente na agricultura contemporânea complementando as abordagens tradicionais de melhoramento genético vegetal ou tratamentos químicos das culturas (Altpeter *et al.*, 2005). A biotecnologia explora a vantagem de acelerar a investigação da função de um gene de interesse pela transferência do mesmo para as espécies vegetais de interesse, enquanto o melhoramento clássico oferece a oportunidade de identificar novos elementos genéticos que controlam características de interesse através da exploração da diversidade natural (Lopes *et al.*, 2010).

No caso do eucalipto, algumas ferramentas foram criadas para auxiliar o seu melhoramento. Dentre elas destacam-se o sequenciamento do genoma de *E. grandis*, cujas seqüências estão disponíveis no site *EucalyptusDB* (Public Eucalyptus Genome Resource), a identificação de um grande conjunto de unigenes oriundos de madeira disponibilizado no banco de dados EUCAWOOD (<http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/eucalyptus/eucawood/>), e os bancos de seqüências expressas (ESTs) do FORESTs e Genolyptus. Essas descobertas criaram um recurso valioso para estudos de genômica funcional e melhoramento molecular em gêneros de importância econômica (Rengel *et al.*, 2009), auxiliando também na divulgação de dados genômicos de eucalipto para a comunidade científica. Esses bancos representam também uma importante fonte de identificação e clonagem de seqüências regulatórias de genes com padrão de expressão conhecido, tema de estudo do nosso laboratório.

Um dos principais desafios na aplicação da biotecnologia de plantas é desenvolver cassetes de expressão compactos que permitam a expressão do transgene nos locais desejados e com o melhor custo-eficácia. Nesse caso, a escolha do promotor é de extrema importância

(Xu *et al.*, 2010; Zheng *et al.*, 2011). 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). É processador central da regulação da expressão gênica uma vez que contém os sítios de ligação para a RNA polimerase e seus fatores gerais de transcrição, responsáveis pela transcrição gênica (Griffiths *et al.*, 2005). Promotores constitutivos, como o 35S do vírus do mosaico da couve-flor, são comumente utilizados em programas biotecnológicos destinados a aumentar a resistência em plantas aos estresses bióticos (Zheng *et al.*, 2011). Porém, transgenes sob o controle de tal promotor geralmente são expressos em todos os órgãos e/ou tecidos da planta. Embora seja considerado um promotor forte, o uso do promotor 35S representa um impedimento para a produção de transgênicos nos quais o controle preciso da expressão do transgene é essencial (Singer *et al.*, 2011).

A identificação e caracterização de promotores órgão/tecido-específicos representam uma prioridade nos programas biotecnológicos voltados para a produção de transgênicos, uma vez que o uso dos mesmos tende a evitar a expressão gênica generalizada. Assim, o uso de promotores com padrões específicos de expressão em construções gênicas visando a transformação de plantas de interesse é importante tanto para evitar o desperdício de energia relacionado com a produção de proteínas de interesse em células/tecidos não relevantes, quanto para evitar distúrbios metabólicos advindos da expressão elevada e generalizada do transgene (Vicentini *et al.*, 2005).

Dentre os órgãos/tecidos de escolha para a expressão tecido-específica em eucalipto, a folha representa um alvo importante, especialmente se considerarmos a necessidade de expressão de transgenes voltados para o controle de patógenos e pragas que atacam este órgão. Dessa maneira, a disponibilidade de promotores de genes com expressão específica em folha de eucalipto é de fundamental interesse para aplicação em programas biotecnológicos visando melhorar as propriedades desta importante espécie florestal.

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivos:

- 1) Validar a expressão tecido-específica de um EST selecionado *in silico* e predito como apresentando expressão específica em folha.
- 2) Clonar e sequenciar a região promotora do gene de *Eucalyptus grandis* correspondente ao EST validado.
- 3) Construir um cassete de expressão contendo o gene repórter *uidA* (GUS) sob controle do referido promotor para posterior transformação em *Agrobacterium tumefaciens*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação e seleção do EST específico de folha

O EST correspondente foi identificado no banco de dados do Projeto EST do Eucalipto (Forests) empregando a ferramenta BLAST. O banco FORESTs é constituído por ESTs oriundos do sequenciamento de bibliotecas de cDNAs construídas utilizando RNA mensageiro proveniente de vários órgãos/tecidos em condições normais e sob estresses bióticos e abióticos. Cabe ressaltar que para comparar os níveis de expressão nas diferentes bibliotecas, os dados foram normalizados pelo número de *reads* em cada biblioteca. As análises dos perfis de expressão foram realizadas considerando cada biblioteca individualmente ou pools onde bibliotecas de órgãos/tecidos similares foram agrupadas (Sasaki, 2008).

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 *Arabidopsis thaliana* (AT1G56190.1) que apresenta expressão específica em folha.

3.2 Validação da expressão do EST candidato por RT-PCR

A sequência do EST de eucalipto selecionado *in silico*, número EGCBLV2208C06, está disponibilizada na Figura 01.

```

CTTCATTGCCTGAGGGCGGTGTTCTTCTTCTTGAGAACGTGAGATTTTACAAAGAGGAAGAAAAGAATGAAACC
TGAGTTTGCCAAGAAGCTGGCATCATTGGCAGATCTGTATGTAAATGATGCTTTTGGAAACAGCACACAGGGCT
CATGCTTCTACTGAGGGGGTTACTAAGTTCTTGAAGCCCTCTGTTGCTGGCTTCCTTTTGCAGAAGGAGCTAG
ACTATCTTGTGGGGCTGTGTCTACCCCAAGAGACCATTGCTGCCATTGTGGGTGGCTCAAAAGTCTCATC
CAAGATTGGTGTGATTGAATCTCTTCTAGAGAAGTGTGACATCCTTCTTTTGGGGGGTGGCATGATCTTCACC
TTCTACAAGGCACAGGGTCTCTCTGTTGGTTCTTCTTGGTGGAGGAAGATAAGCTGGATCTTGCAACATCGC
TCCTTAAAAAGGCCAAAGCAAAGGGAGTTTCTTTATTGTTGCCCACTGATGTGGTTATTGCGGACAAGTTTGC
TCCAGATGCAAACAGCAAGATAGTGCCAGCATCTGCCATTCTGATGGCTGGATGGGATTGGATATTGGACCA
GACTCTATTAAGACATTTAATGATGCTCTGGGAAC TACAAAAC TGT CATCTGGAACGGACCCATGGGAGTGT
TTGAGTTTGACAAATTTGCCGCTGGAAC T GAGGCTGTTGCAAAGAAGCTAGCAGAGCTCAGTGCCG CAGGAGT
GACGACCATTATTGGAGGAGGGGACTCTGTTGCAGCTGTGGAGAAAGTTGGAGTTGCTGATGTGATGAGCCAC
ATATCTACTGGTGGTGGTGCCAGTTTGGAGTTGTTGGAAGGCAAAGA AACTTCCTGGTGTGTTGCTCTAGACG

```

Figura 1- Sequência de nucleotídeos do EST EGCBLV2208C06 que faz parte do cluster EGEQLV2001G06.g. Em destaque o códon ATG predito na região codificadora do EST.

A validação da sua expressão foi realizada por transcrição reversa RT-PCR. Para isto, RNA total foi extraído de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto (caule, raiz, folha, fruto e pool de tecidos) empregando o método de CTAB. Para tal, foram utilizados 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido com posterior solubilização em tampão de extração CTAB (Anexo 6.1) pré aquecido e incubado por 10 a 15 minutos a 65°C. Adicionou-se em seguida 500 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico – 24:1) e homogeneizou-se a solução. Centrifugou-se a 12000g por 10 minutos a temperatura ambiente e coletou-se o sobrenadante, aplicando-se novamente o passo anterior de CIA seguido de uma nova centrifugação. Um volume de cloreto de lítio (LiCl 5M) foi adicionado ao volume de sobrenadante coletado e o RNA foi precipitado a 4°C. O sedimento foi lavado em 200 µl de TE-SDS 1%, 100 µl de NaCl 5M e 300 µl de isopropanol 100%. A amostra foi precipitada durante 30 minutos a -20°C e centrifugada a 12000g por 10 minutos a 4°C. Uma lavagem foi realizada com 1 ml de etanol 70% com posterior centrifugação a 7500g por 5 minutos a (4°C), sendo o precipitado ressuspenso em H₂O Milli-Q autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato - DEPC). Alíquotas das amostras foram avaliadas quanto à sua integridade em gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídio (Anexo 6.2).

Para a produção de cDNA, as amostras foram tratadas com DNase I segundo as recomendações do fabricante (MBI Fermentas). Após este tratamento, cada amostra foi submetida à transcrição reversa utilizando Oligo-dTVN17 (10 mM) e a enzima “SuperscriptTM III Reverse Transcriptase” segundo as recomendações do fabricante (Invitrogen). Os cDNAs obtidos foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos (JPhoF 5’AATTACCCCCACATCAGCTGG 3’/ JPhoR 5’GTCGATACAGGCTCACCCAGAT 3’) ao EST selecionado *in silico*. As etapas utilizadas na reação foram: desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma etapa de extensão de 72°C por 10 minutos. A especificidade do padrão de expressão foi confirmada analisando-se os produtos gerados pela amplificação em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A presença ou ausência de bandas correspondentes ao transcrito do gene candidato foi analisada em cada órgão.

3.3 Isolamento da região promotora, clonagem e sequenciamento

O isolamento da região promotora em estudo foi realizado empregando o banco de dados do genoma completo do eucalipto, disponível no site <http://www.phytozome.net/eucalyptus.php>. A sequência do EST validado na etapa anterior (Figura 1) foi empregada para encontrar o lócus correspondente no banco de maneira a permitir o desenho primers específicos para amplificar a região promotora do gene candidato.

A referida região regulatória foi amplificada por PCR empregando DNA genômico de eucalipto extraído a partir de folha.

A extração de DNA genômico 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 6.3) 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 ressuspenso 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.

Os produtos amplificados de PCR 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_ (Sambrook *et al.*, 1989). Mini-preparação por lise alcalina (Anexo 6.4) foi utilizada para a extração dos plasmídeos e uma digestão com *BamHI* e *NcoI* foi realizada para verificar a presença dos fragmentos clonados nos tamanhos corretos, descartando os clones com 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 6.5) foi realizada com um kit comercial de “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos M13 senso e antisenso. Como molde foram utilizados os DNAs plasmidiais contendo os produtos de PCR. As reações de sequenciamento foram realizadas em seqüenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.4 Construção do cassete de expressão

Para a construção do cassete de expressão, a região promotora amplificada por PCR empregando os oligonucleotídeos *Bam*HI (5'-CGCGGATCCGCGAGGACGACAGGGC-3') e *Nco*I (5'-CATGCCATGGTTTACCTTCCCTTGAC-3'), os quais viabilizaram a adição dos sítios de restrição *Bam*HI (5' terminal) e *Nco*I (3' terminal) nas extremidades no produto amplificado, foi inserida no vetor binário pCAMBIA-1381z (Cambia). Para tal, o produto de amplificação obtido foi digerido com as enzimas de restrição citadas, purificado em gel de agarose e inserido no vetor pCAMBIA-1381z igualmente digerido. O uso do sítio *Nco*I permitiu a correta inserção do promotor em fusão transcricional com o início da região codificadora do gene repórter *uidA* (GUS) presente no pCAMBIA-1381z.

Após a ligação, células competentes da cepa DH5 α 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 triptona, 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 μ g/ml de higromicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

Para verificar a correta inserção do promotor no vetor binário foi realizada a digestão do vetor recombinante, extraído por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), com as enzimas de restrição usadas na clonagem. O produto de digestão foi então analisado em gel de agarose 1%. A verificação da inserção foi também realizada por PCR utilizando um oligonucleotídeo promotor-específico (EGRT-conF – 5' CGCGGATCCGCGAGGCAGACAGGGC) e um oligonucleotídeo GUS-específico (GUS-R – 5'GTCTGCCAGTTCAGTTCATTGTT).

O cassete de expressão construído (denominado promPhop: GUS) encontra-se esquematizado na Figura 2.

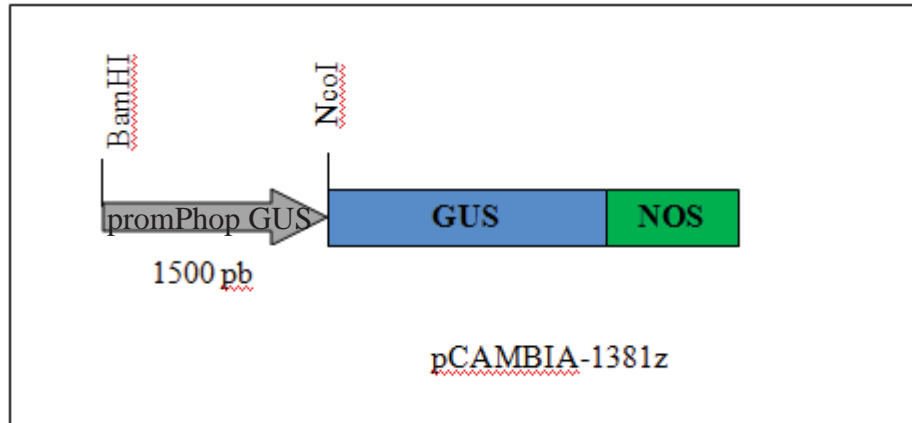


Figura 2- Representação esquemática do cassete de expressão contendo o promotor específico de folha (1500 pb) em fusão transcricional com o gene *uidA* (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z. O terminador da nopalina sintetase (NOS) está representado.

3.5 Transformação do vetor binário em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

O cassete de expressão promPhop: GUS foi transformado nas células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem LBA4404 empregando protocolo descrito (Lacorte e Romano, 1998). Para obtenção de células competentes, uma colônia isolada de agrobactéria da linhagem LBA4404 foi inoculada em 3 ml de meio LB contendo os antibióticos apropriados, e incubada sob agitação (150 rpm) a 28°C por 16 horas. A cultura foi centrifugada a 12.000 rpm por 1 minuto. As células foram solubilizadas em 0,5 ml do tampão Hepes/KOH 1 mM pH 7, mantido a 4°C, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 1 minuto. Esta etapa foi repetida duas vezes. O sedimento bacteriano foi então solubilizado em 0,5 ml de glicerol 10%, mantido a 4°C, e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm. O sedimento bacteriano foi solubilizado em 20 µl de glicerol 10% a 4°C.

Um µg de DNA plasmidial foi adicionado às células competentes, e após homogeneização procedeu-se uma incubação em gelo por 2 minutos. A solução foi transferida para cuvetas de eletroporação e posicionada no Electroporator 2510 Eppendorf sendo aplicado um pulso de 2,5 V por 5 ms. Após o pulso, adicionou-se 1 ml de meio SOC, sendo a amostra

mantida a 28°C por mais 4 horas. Em seguida, cerca de 100 µl da suspensão de células foi plaqueada em meio LB contendo 20 µl de Rifamicina (100 mg/ml), 1,67 µl de Estreptomicina (300 mg/ml) e 20 µl de higromicina (100 mg/ml). As placas foram então incubadas a 28°C por três dias para aguardar o crescimento de colônias.

Para confirmação da transformação, colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido a 28°C por 20 horas, e após a extração dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) (Anexo 6.2), os mesmos foram submetidos à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos internos, um posicionado junto ao sítio de clonagem *Bam*HI, e outro complementar à região codificadora do gene GUS. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%.

3.6 Elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor

A região promotora foi analisada quanto à presença de elementos *cis*-regulatórios utilizando os programas PlantCARE e PLACE disponíveis nos endereços: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> e <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/> .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Validação da expressão por RT-PCR do candidato

O EST candidato (EGCBLV2208C06) utilizado para a clonagem da região promotora foi selecionado por análises *in silico* no banco de dados FORESTs e validado quanto ao seu perfil de expressão empregando RT-PCR. Os resultados obtidos confirmam que o referido candidato apresenta expressão específica em folha de eucalipto como previsto pela análise *in silico* (Figura 3). O padrão observado contrasta com o padrão ubíquo de expressão obtido para um gene de eucalipto (*GAPDH*) considerado constitutivo (Figura 4).



Figura 3- Validação da expressão tecido-específica do candidato selecionado empregando RT-PCR. As amplificações foram realizadas utilizando amostras de cDNA provenientes de **1-** caule; **2-** raiz; **3-** folha; **4-** fruto; **5-** pool de tecidos; Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

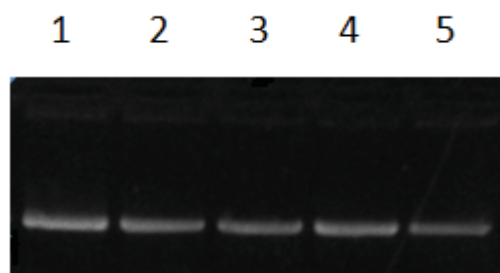


Figura 4- Amplificação do gene normalizador *GAPDH* em diferentes órgãos/tecidos de eucalipto. As amplificações foram realizadas utilizando amostras de cDNA provenientes de **1-** caule; **2-** raiz; **3-** folha; **4-** fruto; **5-** pool de tecidos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2 Isolamento da região promotora

A sequência do EST candidato validado por RT-PCR foi utilizada para o isolamento de sua região promotora. Para tal, oligos gene-específicos foram desenhados para a amplificação da região situada à montante da sequência do EST, mais especificamente acima do ATG iniciador (Figura 1). Essa região foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico extraído de eucalipto, e o produto resultante foi clonado e sequenciado.

4.2.1 Elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor amplificado

A sequência promotora obtida foi analisada quanto à presença de elementos regulatórios utilizando o banco de dados do PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>). Nessa análise foram identificados alguns elementos regulatórios que caracterizam o fragmento sequenciado como uma região promotora como mostra a Tabela 2.

Tabela 2- Elementos *cis*-regulatórios relevantes encontrados na análise do promotor em estudo nos bancos de dados PLACE e PlantCARE.

Nome	Sítio	Sequências consenso	Função predita
ASF1MOTIFCAMV	S000024	TGACG	Presente no promotor viral CaMV35S. Envolvido na ativação da transcrição de genes por auxina e/ou ácido salicílico; relevante para regulação de luz; é estimulado por estresse biótico e abiótico.
CACTFTPPCA1	S000449	YACT	Componente chave encontrado em promotores de dicotiledôneas, capaz de dirigir a expressão em mesófilo.
CCAATBOX1	S000030	CCAAT	Encontrado no promotor de genes que codificam proteínas “heat shock”.
DRECRTCOREAT	S000418	RCCGAC	Motivo DRE/CRT (dehydration-responsive element/C-repeat) relacionado com resposta a estresse hídrico.
GATABOX	S000039	GATA	Requerido para a expressão tecido-específica, sendo regulado por luz.
GT1CONSENSUS	S000198	GRWAAW	Presente em promotores de genes regulados por luz.
IBOX	S000124	GATAAG	Sequência conservada em promotores de genes regulados por luz.
IBOXCORE	S000199	GATAA	Sequência conservada em promotores de genes regulados por luz em monocotiledôneas e dicotiledôneas.

IBOXCORENT	S000424	GATAAGR	Associado a regiões promotoras de genes com resposta a luz.
MYBCORE	S000176	CNGTTR	Sítio de ligação de fatores de transcrição do tipo MYB. Responde ao estresse hídrico em <i>Arabidopsis</i> .
WRKY71OS	S000447	TGAC	Sítio de ligação de fatores de transcrição do tipo WRKY e relacionado à resposta a estresses.
SORLIP2AT	S000483	GGGCC	Sequências altamente presentes em promotores induzidos por luz.

4.3 Construção do cassete de expressão promPhop:GUS

O fragmento promotor amplificado na etapa anterior foi purificado em gel, introduzido no vetor pCAMBIA 1381-z e transformado em *E. coli* DH5 α . Após a transformação, a verificação da inserção no plasmídeo recombinante foi realizada por digestão empregando as enzimas *NcoI* e *BamHI*. Seis clones foram analisados e todos confirmaram a presença do inserto (Figura 5). Os clones positivos foram também submetidos a PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos ao promotor e ao gene repórter (EGRT-conF e GUS-R), e um produto de tamanho esperado foi observado.

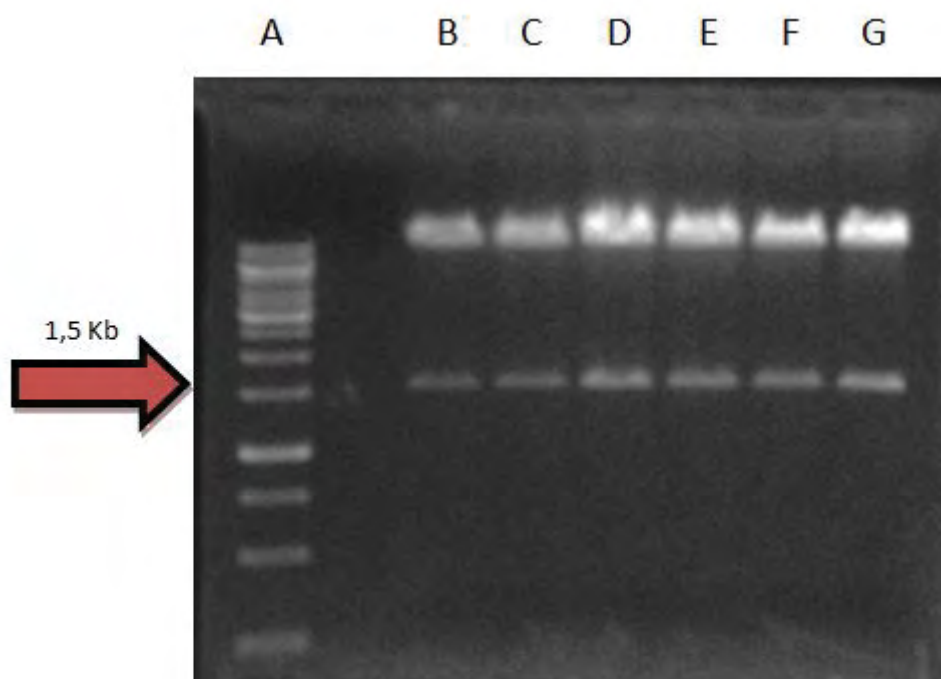


Figura 5- Digestão com as enzimas *NcoI* e *BamHI* do cassete de expressão contendo o promotor específico de folha inserido em pCAMBIA 1381-z. **A-** Ladder 1 Kb; **B a G-** colônias positivas. Os produtos de digestão foram visualizados em gel de agarose 1%. A seta indica a posição do produto esperado (1,5 Kb).

Os clones B e C foram selecionados e submetidos à reação de sequenciamento para a verificação da correta inserção do promotor no vetor pCAMBIA 1381-z, a qual foi devidamente confirmada.

4.4 Confirmação da transformação em *Agrobacterium tumefaciens*

O vetor binário pCAMBIA-1381z contendo o cassete de expressão promPhop:GUS foi transformado em *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404 de acordo com protocolo já descrito (item 3.5). As agrobactérias recombinantes foram identificadas através de PCR empregando um oligonucleotídeo posicionado no sentido senso da seqüência promotora e o outro complementar à região codificadora do gene repórter GUS, próximo ao ATG, originando um fragmento de aproximadamente 1500 pb (Figura 6).

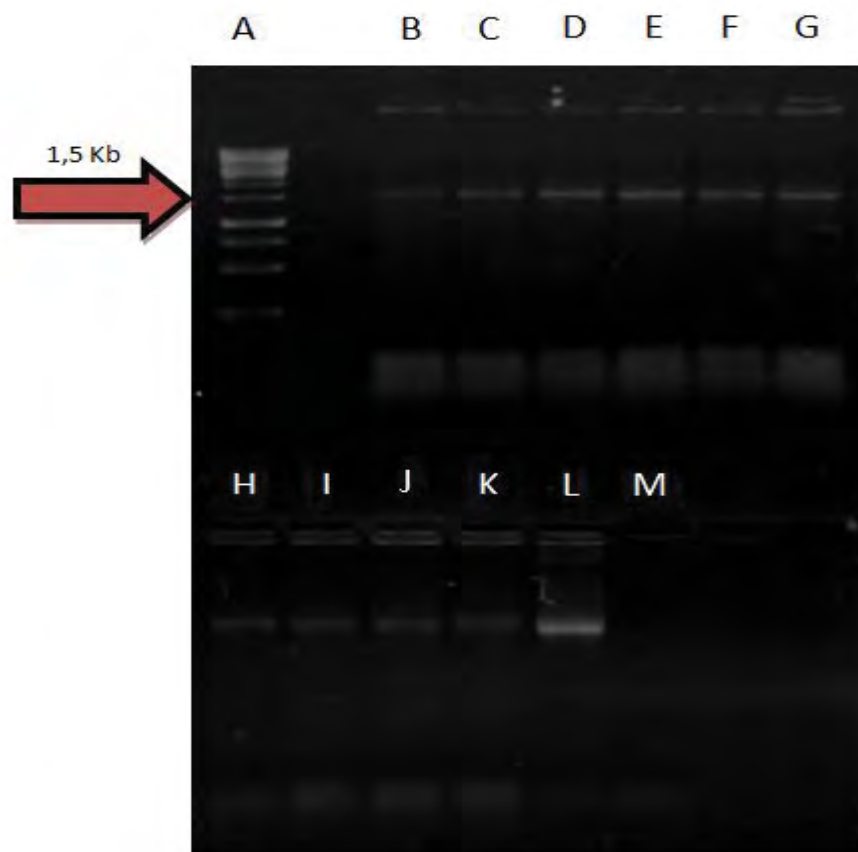


Figura 6- PCR confirmatório da transformação do vetor binário contendo o promotor promPhosp:GUS em *A. tumefaciens*. **A-** Ladder 1 Kb; **B a K-** colônias positivas; **L-** Controle positivo; **M-** Controle negativo (sem DNA). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. A seta indica a posição do produto esperado (1,5 Kb).

5. CONCLUSÕES

A região promotora do gene com expressão específica em folha de eucalipto foi clonada e seqüenciada, e um cassete de expressão contendo o referido promotor em fusão com o gene repórter GUS foi obtido. Desse modo, podemos inferir que os resultados obtidos neste trabalho com a construção do cassete de expressão promPhosp: GUS irão permitir futuras análises funcionais deste promotor em plantas transformadas e posteriormente regeneradas.

6. ANEXOS

6.1 Tampão CTAB para extração de RNA - estoque (100 ml):

2% CTAB (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide), 2% PVP (polyvinylpyrrolidone K 40), 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, q.s.p. água Milli-Q. Autoclavar o tampão.

6.2 Gel de agarose desnaturante 1% para RNA (40 ml):

Adiciona-se 0.4 g de agarose, 4 ml MOPS 10X, 2 ml formaldeído, 34 ml água deionizada tratada com DEPC. Ferver no microondas até dissolver completamente a agarose e adicionar 1 µl de brometo de etídio (10 mg/ml).

Tampão de carregamento desnaturante:

Para cada amostra: 2 µl de MOPS 10X, 3 µl formaldeído, 10 µl formamida, 2 µl de tampão de carregamento 1X, 3 µl de RNA total. Desnaturar as amostras com o tampão por 15 min a 65°C e dar um choque térmico no gelo.

6.3 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.

6.4 Mini- preparação de plasmídeos por lise alcalina

Referência: Sambrook *et al.* (1989) e 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 micro- centrífuga 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 vórtex.

- 3) Adicionar 300 µl de P2. Agitar por inversão suave do tubo e incubar a 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 empregadas:

- 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.

6.5 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)
H ₂ O	completar para 10.0
Volume total	10.0

7. REFÊNCIAS

ABRAF, A849a **Anuário estatístico da ABRAF 2010 ano base 2009/ ABRAF**. – Brasília, 140p. Brasília, 2010.

ABRAF, A849a **Anuário estatístico da ABRAF 2011 ano base 2010/ ABRAF**. – Brasília, 130p. Brasília, 2011.

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. Mol. Biol.**, v.57, p.271–283, 2005.

ARAGÃO, F. J. L.; SANTOS, M. O.; MORAIS, L. S.; ROMANO, E. **Metodologias para transformação genética de Plantas-Modelo**. Brasília: EMBRAPA, 2002. Circular Técnica, 15.

BOERJAN, W. Biotechnology and the domestication of forest trees. **Curr. Opin. Biotech.**, v.16, p.159–166, 2005.

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Relatório de desempenho do setor de celulose e papel e projeções**. São Paulo: BRACELPA, 2007.

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Relatório de sustentabilidade**. São Paulo: BRACELPA, 2010.

BRASILEIRO, A. C. M.; ARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

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

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C.; WESSLER, S.R.; SUZUKI, D.T. RNA: Transcription and processing. In:-. **Introduction to genetic analysis**. 8 ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2005.

GRIFFITHS, A. J. F., MILLER, J. H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R. C., GELBART, W. M. Introdução à genética. Editora Guanabara Koogan S.A., 8a ed, 2006.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.V. GUS fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile marker in higher plants. **EMBO J.**, v.6, p.3901-3907, 1987.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998.

LEITE, S. M. M. **Variabilidade genética em uma população-base de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden através do marcador RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)**. 1998. Dissertação (mestrado) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

LOPES, F.J.F.; PAULY, M.; BROMMONSHENKEL, S.H.; LAU, E.Y.; DIOLA, V.; PASSOS, J.L.; LOUREIRO, M.E. The EgMUR3 xyloglucan galactosyltransferase from *Eucalyptus grandis* complements the mur3 cell wall phenotype in *Arabidopsis thaliana*. **Tree Genet. Genom.**, v.6, p.745–756, 2010.

MOURA, L. A; GARCIA, C. H. **Eucalypt cultivation in Brazil**. São Paulo: SP, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, p.473-497, 1962.

RENGEL, D.; CLEMENTE, H.S.; SERVANT, F.; LADOUCE, N.; PAUX, E.; WINCKER, P.; COULOUX, A.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. **BMC Plant Biol.**, v.9, p.1471-2229, 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/36>>. Acesso em: 03 nov. 2011.

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1659, 1989.

SASSAKI, F. T. **Isolamento e Caracterização de Promotores Órgão-específicos a partir de informações do Banco FORESTs (Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium)**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

SINGER, S.D.; COX, K.D.; LIU, Z. Enhancer–promoter interference and its prevention in transgenic plants. **Plant Cell Rep.**, v.30, p.723-731, 2011.

VICENTINI, R.; SASSAKI, F.T.; GIMENES, M.A.; MAIA, I.G.; MENOSSI, M. *In silico* evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome. **Genet. and Mol. Biol.**, v.28, p.487-495, 2005.

WERNER, T. Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. **Mamm. Genome**, v.10, p.168–175, 1999.

XU, X.; GUO, S.; CHEN, K.; SONG, H.; LIU, J.; GUO, L.; QIAN, Q.; WANG, H. A 796 bp PsPR10 gene promoter fragment increased root-specific expression of the GUS reporter gene under the abiotic stresses and signal molecules in tobacco. **Biotechnol. Lett.**, v.32, p.1533-1539, 2010.

ZHENG, H.; LEI, Y.; LIN, S.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z. Bidirectionalization of a methyl jasmonate-inducible plant promoter. **Biotechnol. Lett.**, v.33, p.387–393, 2011.