

CAROLINA DOS SANTOS COSTA

**Caracterização de promotores de Eucalipto com
expressão tecido-específica: raiz e folha**

Botucatu – SP

2011

CAROLINA DOS SANTOS COSTA

**Caracterização de promotores de Eucalipto com
expressão tecido-específica: raiz e folha**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu (SP), para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Botucatu – SP

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

Costa, Carolina dos Santos.

Caracterização de promotores de Eucalipto com expressão tecido-específica :
raiz e folha / Carolina dos Santos Costa. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20203004

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Genética vegetal. 3. Plantas transgênicas.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Promotores; Tecido-especificidade;
Transportadores de potássio de alta afinidade.

*Dedico essa dissertação aos meus
pais, José e Maria Aparecida*

Agradecimentos

À Deus, pela vida e por todas as conquistas.

Aos meus pais, pelo amor, confiança, dedicação, incentivo e apoio financeiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, pela competência, profissionalismo e por todo aprendizado e conhecimento adquirido durante este projeto.

A Juliana Bravo, pela ajuda, aprendizagem, apoio e dedicação durante a realização deste projeto.

Aos companheiros de laboratório, Juliana, Flávio, Márcio, Rodrigo, Fábio, Alessandra Vasconcellos, Alessandra Tenório, Larissa, pela ajuda, companheirismo e amizade.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Celso Luis Marino pelo companheirismo.

Ao grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a Maria Isabel Nogueira Cano pelo companheirismo.

Ao Rodrigo pelo carinho.

À amiga Cristiane Maria Machado, pela amizade, carinho, dedicação, confiança e companheirismo.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. André Sampaio Pupo, pela ajuda nos ensaios fluorimétricos.

Ao grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Fernandes Boaro, por fornecer todas as condições para realização dos experimentos em hidroponia.

Ao grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a Tatiane Maria Rodrigues, pela ajuda na confecção das lâminas permanentes.

À Universidade Estadual Paulista, em especial o Departamento de Genética, que forneceu toda estrutura para a realização deste projeto.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Temos de nos tornar
a mudança que queremos ver
no mundo.”

Mahatma Gandhi

Resumo

A identificação de promotores com expressão tecido-específica é uma alternativa viável para substituição dos promotores com expressão ubíqua geralmente utilizados em transgenia. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar funcionalmente o promotor de um gene de eucalipto que codifica um transportador de potássio com expressão específica em raiz bem como isolar e caracterizar a região promotora de um gene de eucalipto selecionado como apresentando expressão específica em folha. Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) contendo um cassete de expressão composto pelo promotor de raiz fusionado ao gene repórter GUS (que codifica a β -glucoronidase) foram usadas em ensaios histoquímicos e histológicos para investigar a especificidade da expressão determinada pelo promotor em estudo. Os resultados evidenciaram que o promotor investigado dirige a expressão do gene repórter em tecido vascular de folhas e raízes. A expressão em feixes vasculares de folhas e raízes foi confirmada em cortes histológicos. Visando avaliar a resposta deste promotor a baixas concentrações de potássio, duas linhagens da geração T2 foram submetidas à deficiência de potássio, e a expressão relativa do gene repórter GUS foi determinada por PCR em tempo real. Nas linhagens submetidas a estresse de potássio observou-se um aumento da expressão relativa do gene repórter GUS em função da privação do elemento. Em paralelo, um gene selecionado *in silico* como apresentando expressão em folha de eucalipto teve seu perfil de expressão validado por RT-PCR. A construção de um cassete de expressão contendo o referido promotor fusionado ao gene repórter GUS foi empreendida visando futuras validações funcionais.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*; Promotores; Tecido-especificidade;

Transportadores de potássio de alta afinidade

Abstract

The identification of tissue-specific promoters is of great value to substitute the ubiquitous promoters generally used in transgenic production. In this context, the present study aimed to functionally characterize the promoter of a *Eucalyptus grandis* gene encoding a potassium transporter showing root specific expression, and to isolate and functionally characterize the promoter region of an *E. grandis* gene selected as showing specific expression in leaf. Transgenic tobacco plants (*Nicotiniana tabacum* SR1) harboring a promoter:GUS fusion were used to investigate the expression specificity of the selected root promoter. The results showed that the investigated promoter drives a reporter gene expression in vascular tissues of leaves and roots. The expression in vascular bundles of leaves and roots was confirmed in histological cross-sections. To evaluate the promoter responsiveness to low potassium concentrations, two transgenic lines (T2) were submitted to potassium starvation and the relative expression of the GUS reporter gene was determined by real time PCR. An increase in the relative expression of GUS in response to potassium starvation was observed. In parallel, the expression pattern of a gene showing leaf specific expression in *Eucalyptus grandis* was validated by RT-PCR. The construction of an expression cassette containing this promoter fused to the GUS reporter gene was performed aiming future functional characterization.

Key words: *Eucalyptus grandis*; Promoters; Tissue-specificity; High affinity potassium transporter

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
Sumário	3
Introdução.....	5
1.1. O Eucalipto	6
1.2. Promotores.....	8
1.3. Promotores de Eucalipto.....	12
1.4. Transportadores de potássio de alta afinidade	13
2. Objetivos	19
3. Material e métodos.....	20
3.1. Análise funcional do promotor de raiz.....	20
3.1.1. Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes no promotor específico de raiz.....	21
3.1.2. Germinação das sementes de tabaco (T1) contendo o cassete de expressão do promotor específico de raiz fusionado ao gene <i>uidA</i> (GUS)	21
3.1.3. Ensaio Histoquímico de GUS	22
3.1.4. Cortes Histológicos.....	22
3.1.5. Crescimento em solução hidropônica e indução de estresse	23
3.1.6. Ensaio histoquímico de GUS em plântulas submetidas a estresse de K	23
3.1.7. Extração de RNA total de tabaco	24
3.1.8. Expressão transiente em eucalipto	27
3.2. Identificação do EST com expressão específica em folha de eucalipto	33
3.2.1. Identificação do EST com expressão específica em folha	33
3.2.2. Validação da expressão por RT-PCR.....	34
3.2.3. Isolamento da região promotora do EST EGJFLV3247C08.g com expressão específica de folha.....	35
3.2.4. Extração de DNA genômico de Eucalipto	36
3.2.5. Construção das bibliotecas GW.....	37
3.2.6. Clonagem e sequenciamento do produto de amplificação	37
3.2.7. Construção do cassete de expressão	38
4. Resultados	40

4.1. Análises do Promotor de Raiz	40
4.1.1. Elementos <i>cis</i> -regulatórios presentes no promotor	40
4.1.2. Ensaio histoquímico	42
4.1.3. Ensaio histoquímico em plântulas submetidas a estresse de K	44
4.1.4. Análise da expressão relativa do gene GUS por RT-qPCR	46
4.1.5. Expressão Transiente	49
4.2. Análises do Promotor de Folha	52
4.2.1. Validação biológica do candidato com expressão específica de folha	52
4.2.2. Extração de DNA genômico de eucalipto	54
4.2.3. Isolamento da região promotora	54
4.2.4. Clonagem e sequenciamento da região amplificada no GW	56
4.2.5. Correlação da região amplificada com o EST	57
4.2.6. Construção do cassete de expressão	58
4.2.7. Sequenciamento do cassete de expressão contendo o promotor de folha	60
5. Discussão	61
5.1. Caracterização funcional do promotor de raiz	61
5.2. Promotor de folha	66
6. Conclusão	68
7. Perspectivas	69
8. Referências	70

Introdução

O eucalipto representa a principal fonte de matéria-prima para a produção de papel e celulose no Brasil, que produziu no ano de 2010 aproximadamente 14,1 milhões de toneladas de papel e 9,8 milhões de toneladas de celulose. Devido a sua perfeita adaptação às condições brasileiras, *Eucalyptus grandis* é a principal espécie plantada.

Apesar de todo o conhecimento científico acumulado sobre essa espécie nos últimos anos, diversos pontos importantes ainda requerem investimentos em pesquisa e tecnologia. Ganha destaque no cenário atual a adoção de estratégias que permitam acelerar o melhoramento genético dessa espécie em um curto espaço de tempo, e a biotecnologia tem se destacado nesse contexto. A inserção do eucalipto no contexto biotecnológico requer, entretanto, que novas ferramentas sejam produzidas e disponibilizadas, especialmente aquelas voltadas para o controle adequado da expressão de transgenes em plantas modificadas geneticamente.

Neste sentido, estudos visando à identificação e caracterização de promotores com expressão tecido-específica são de fundamental importância, pois estes promotores direcionam a expressão de transgenes apenas nos órgãos/tecidos de interesse, evitando assim a expressão generalizada que acarreta um elevado custo energético para a planta e consequentemente diminui a aceitação do produto por parte dos consumidores.

Neste trabalho, a região promotora de um gene de *E. grandis* validado como apresentando expressão específica em raízes foi isolado através da técnica de *Genome Walking* e clonado no vetor pCAMBIA 1381-z, fusionado transcricionalmente ao gene GUS. A identificação deste gene foi baseada em um gene que codifica um transportador de potássio que pertence à classe dos transportadores de potássio de alta afinidade em

Arabidopsis thaliana (Ahn *et al.*, 2004), o qual é induzido sob baixas concentrações do elemento. Plantas de tabaco transgênicas transformadas com o cassete de expressão contendo o referido promotor foram geradas por Ribeiro (2009), visando a posterior caracterização funcional deste promotor. Em paralelo foi realizado o isolamento da região promotora de um gene validado como apresentando expressão específica em folha visando à construção de um cassete de expressão para posterior transformação de *Agrobacterium tumefaciens* seguido da transformação de plantas de tabaco para caracterização do referido promotor.

A maioria dos promotores de *Eucalyptus* caracterizado até o momento é específica de tecido vascular, e deriva de genes cujos produtos estão envolvidos na via da síntese da lignina (Lauvergeat *et al.*, 2002). Portanto, a disponibilidade de promotores específicos de outros órgãos/tecidos de eucalipto é de fundamental interesse para aplicação nos programas biotecnológicos que visam melhorar suas propriedades.

1.1. O Eucalipto

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae*, é originário da Austrália, com exceção das espécies *E. urophylla* e *E. deglupta* que são originários do Timor e Papua Nova Guiné, respectivamente (Pryor, 1985). O gênero possui cerca de 600 espécies adaptadas a diversas condições de clima e solo, sendo as espécies *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. calmadulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis* as mais utilizadas para fins comerciais (Mora *et al.*, 2000).

O gênero *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1825 como espécie ornamental e como quebra-vento (Scarpinella, 2002). No ano de 1903 iniciou-se o seu

uso para fins econômicos, visando suprir a necessidade de dormentes para o desenvolvimento das estradas de ferro pela Companhia Paulista de Estradas de Ferro – CPEF (Andrade, 1961).

O representante mais conhecido deste gênero no Brasil é a espécie *Eucalyptus grandis*, que possui um crescimento e rendimento volumétrico superiores em relação às outras espécies, fornecendo uma madeira medianamente leve e fácil de ser trabalhada. Quando essa espécie é submetida ao ciclo longo de cultura, sua madeira pode ser utilizada na construção civil e serrarias, ou então, quando submetida ao ciclo curto de cultura, pode ser empregada na produção de caixotes, mourões e carvão. Além disso, representa a principal espécie para a produção de celulose, painéis, aglomerado e chapas duras (Scarpinella, 2002).

O setor de base florestal brasileiro representa 3,4 % do Produto Interno Bruto Nacional (PIB), o que equivale a US\$ 44,6 bilhões (SBS, 2008), tendo produzido no presente ano cerca de 14,1 milhões de toneladas de papel e 9,8 milhões de toneladas de celulose. Existem no Brasil cerca de 2,2 milhões de hectares de florestas plantadas para fins industriais, distribuídas por 18 estados, contabilizando um total de 222 empresas com atividades em 539 municípios (Bracelpa, 2011). Com exportações da ordem de 6,8 bilhões de dólares, o setor de base florestal gera cerca 115 mil empregos diretos (68 mil na indústria e 47 mil em florestas) e 575 mil empregos indiretos. De janeiro a maio de 2010, o Brasil exportou aproximadamente 17% de sua produção total de celulose para a América do Norte, 9% para a Ásia/Oceania, 26% para a China, 1% para a América Latina e 47% para a Europa (Bracelpa, 2011).

1.2. Promotores

A regulação da expressão gênica em nível transcricional é o ponto chave para muitos processos celulares (Butler *et al.*, 2001). O início da transcrição é a etapa mais regulada da expressão gênica, fato este que reflete a porcentagem do genoma dedicada aos fatores de transcrição em plantas e em outros eucariotos. Essa etapa é controlada essencialmente pela região promotora do gene (Singh, 1998).

Em plantas, um promotor básico consiste de uma região *core* que se encontra associada a elementos *cis*-atuantes proximais. A ligação do complexo de pré-iniciação (PIC) ao promotor *core* é basicamente universal em todos os eucariotos e envolve os fatores gerais de transcrição (FGT). Em eucariotos, o promotor *core* atua como uma plataforma para a ligação do complexo de pré-iniciação que inclui, no caso dos genes transcritos pela RNA polimerase do tipo II, os fatores de transcrição TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH e a própria RNA polimerase II. Estes atuam em conjunto para especificar o início da transcrição (Thomas *et al.*, 2006). Entenda-se por promotor *core*, portanto, a região mínima do promotor necessária para direcionar a transcrição (Venter *et al.*, 2004).

Um promotor *core* se estende do sítio de início da transcrição (+1) a até cerca de 35 nucleotídeos desta posição. Portanto, o promotor *core* possui cerca de 40 a 50 nucleotídeos de comprimento, podendo, às vezes, conter de 70 a 80 nucleotídeos. Está localizado em uma posição única que é importante para o processo da transcrição, sendo alvo de ação de fatores específicos que controlam a atividade transcricional de cada gene (Butler *et al.*, 2001).

Vários elementos regulatórios compõem o promotor core. O TATA Box, por exemplo, é uma região rica em A/T que apresenta a sequência consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G). Está localizado a cerca de 30 nucleotídeos da extremidade 5' do ponto de início da transcrição em promotores de genes transcritos pela RNA polimerase do tipo II. Esse elemento é normalmente reconhecido por uma subunidade do complexo TFIID denominada de proteína de ligação ao TATA Box (TBP) (Butler *et al.*, 2001). O BRE (elemento de reconhecimento do TFIIB) está localizado imediatamente acima do TATA box, aumentando a afinidade do TFIIB ao promotor core (Lagrange *et al.*, 1998). O iniciador (Inr), por sua vez, é uma sequência rica em pirimidina PyPyA+1N(T/A)PyPy encontrada tanto em promotores que contém o TATA Box como naqueles que não o contém. Circundando o ponto de início de transcrição, ele é capaz de direcionar precisamente o início de transcrição isoladamente, ou em conjunto com o TATA Box e outros elementos presentes junto ao promotor core (Thomas *et al.*, 2006). O *Downstream Promoter Element* (DPE) foi identificado como sítio de reconhecimento do TFIID, estando localizado na direção 3' do Inr (Burke *et al.*, 1996). A região localizada entre o Inr e o DPE é essencial para a atividade transcricional de promotores, especialmente daqueles que não são dotados de TATA Box, considerados dependentes do DPE (Kutach *et al.*, 2000).

A RNA polimerase não pode dar início à transcrição sem o auxílio dos FGTs, já que não consegue reconhecer o promotor core. Portanto, uma série de eventos deve ocorrer para que o processo tenha início, sendo necessária a participação dos referidos fatores (Figura 1). No caso dos promotores de classe II (reconhecidos pela RNA pol II), o TBP se liga ao TATA Box, em seguida as subunidades TAF1 e TAF2 reconhecem o iniciador e as subunidades TAF6 e TAF9 interagem com o DPE (Juven-Gershon *et al.*,

2010). O TFIIA auxilia a ligação do TFIID ao promotor core após a ligação da maquinaria geral de transcrição que consiste de TFIIB, RNAPII, TFIIF, TFIIE e TFIIH, assim como o complexo co-ativador (Goodrich *et al.*, 2010).

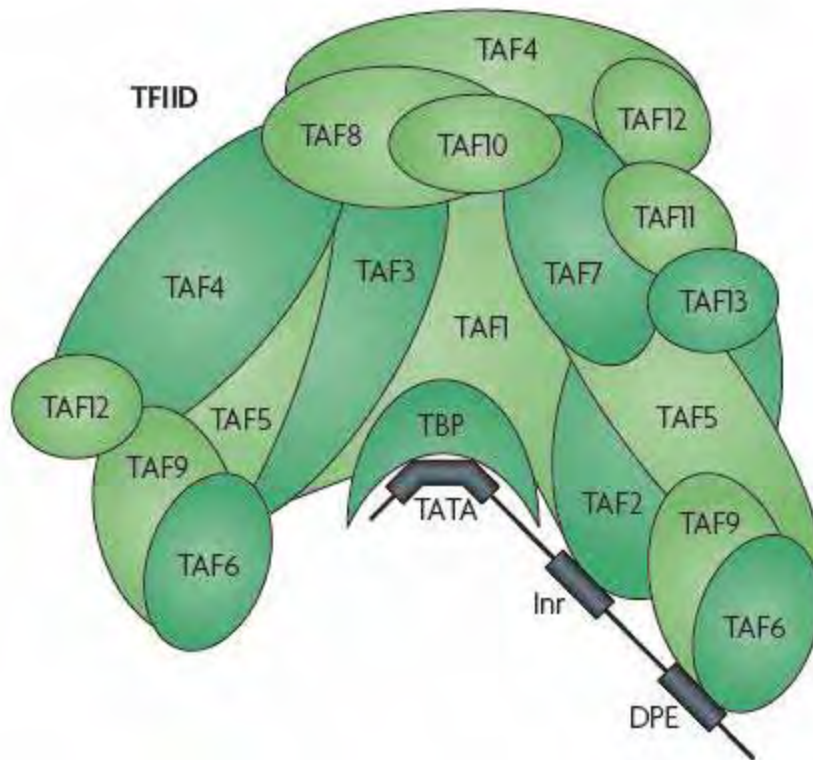


Figura 1- Múltiplas subunidades do complexo TFIID se ligam aos elementos do promotor core (Goodrich *et al.*, 2010).

Atualmente, os promotores mais utilizados em plantas geneticamente modificadas são o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e os promotores dos genes da nopalina e octopina de *Agrobacterium tumefaciens*. Esses promotores, entretanto, são considerados ubíquos e promovem a expressão do transgene em todos os órgãos da planta, característica que, em diversas situações, não é desejada nem necessária. Nesse aspecto, a expressão de proteínas antimicrobianas e inseticidas em plantas transgênicas pode ser citada como um exemplo típico. A princípio, a expressão dessas proteínas deveria acontecer somente nos tecidos de infecção ou

infestação, e não nos tecidos utilizados para consumo humano ou animal (Vijaybhaskar *et al.*, 2008). Outros problemas são acarretados pela expressão generalizada de transgenes tais como a esterilidade, desenvolvimento retardado, morfologia anormal, perda de rendimento, composição de grãos alterada ou silenciamento gênico (Gago *et al.*, 2011). Estudos mostraram, por exemplo, que a super-expressão constitutiva do gene *ipt* (isopentenil transferase) afeta gravemente o crescimento e desenvolvimento da planta (Kunkel *et al.*, 1999). A ação inesperada destes no ambiente também é um fator importante a ser destacado, levando assim a uma menor aceitação do produto por parte dos consumidores.

Por definição, os promotores denominados específicos regulam a expressão gênica em determinados órgãos/tecidos, linhagens ou tipos celulares, em determinados estágios do desenvolvimento ou em resposta a presença de indutores ou repressores específicos, como agentes químicos, estresses fisiológicos ou compostos endógenos. Estes são de grande interesse para a produção de transgênicos, sobretudo se considerarmos que a expressão generalizada de um dado transgene pode gerar um custo energético elevado para a planta. Este custo pode ser minimizado com a expressão direcionada do transgene nos órgãos/tecidos em que é exigido (Vijaybhaskar *et al.*, 2008), diminuindo assim os problemas causados pela expressão ubíqua dos transgenes como mencionado. Do ponto de vista acadêmico, tais estudos colaboram para o aprofundamento dos estudos visando compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de expressão gênica e de diferenciação tecidual.

1.3. Promotores de Eucalipto

Entre as espécies florestais, poucos são os promotores com expressão tecido-específica identificados e caracterizados funcionalmente. No caso do eucalipto, os mais estudados são os promotores de genes envolvidos na via biossintética da lignina que possuem expressão específica em tecidos vasculares. Um exemplo bem conhecido é o promotor do gene *EgCAD2* de *Eucalyptus gunnii* cuja possível utilização na composição de cassetes de expressão permite direcionar a expressão de transgenes em tecidos vasculares (Lauvergeat *et al.*, 2002). Outro exemplo bem sucedido de promotores tecido-vasculares de espécies do gênero *Eucalyptus* é o promotor *EgCCR* de *Eucalyptus gunni* que demonstrou direcionar a expressão em tecido vascular de uvas transformadas com o cassete de expressão (Gago *et al.*, 2011). Por outro lado, não existem registros na literatura relatando a identificação e caracterização de promotores que direcionem a expressão em outros órgãos do eucalipto como folhas, raízes etc.

A identificação de promotores que direcionem a expressão de forma específica e regulada tem um grande apelo biotecnológico já que são essenciais para direcionar a expressão dos genes de interesse apenas nos órgãos/tecidos desejados ou naqueles que são alvo de infestação de pragas e patógenos. Uma vez disponíveis, esses promotores podem ser usados na construção de cassetes de expressão com transgenes específicos, os quais serão empregados na produção de material transgênico com características aprimoradas.

Neste trabalho, a região promotora de um gene de *E. grandis* validado como apresentando expressão específica em raízes foi isolado através da técnica de *Genome*

Walking e clonado no vetor pCAMBIA 1381-z, fusionado transcricionalmente ao gene GUS. A identificação deste promotor foi baseada em um gene que codifica um transportador de potássio que pertence à classe dos transportadores de potássio de alta afinidade em *Arabidopsis thaliana* (Ahn *et al.*, 2004), o qual é induzido sob baixas concentrações do elemento. Plantas de tabaco transgênicas transformadas com um cassete de expressão contendo o referido promotor foram geradas por Ribeiro (2009) visando a posterior caracterização funcional do mesmo. Em paralelo foi realizado o isolamento da região promotora de um gene validado como apresentando expressão específica em folha. A identificação deste promotor foi baseada em um gene que codifica a enzima tirosina descarboxilase, possuindo funções importantes no fluxo de carbono nas vias metabólicas que convertem metabólitos primários em metabólitos secundários (Kawalleck *et al.*, 1993). O promotor correspondente foi inserido em um cassete de expressão para posterior transformação de *Agrobacterium tumefaciens* seguida da transformação de plantas de tabaco para caracterização funcional.

1.4. Transportadores de potássio de alta afinidade

O potássio é o cátion mais abundante nas plantas, representando cerca de 3% a 5% do peso seco total. Desempenha funções importantes em diferentes processos fisiológicos tais como osmorregulação, fotossíntese, regulação do pH, regulação da abertura dos estômatos, além de atuar como cofator enzimático. Por manter o potencial da membrana plasmática (Gierth *et al.*, 2005), a sua concentração é mantida constante no citosol a 100 mM (Martinez-Cordero *et al.*, 2005). Embora o potássio seja o elemento mais abundante na crosta terrestre, a maior parte não está disponível para as plantas

devido ao fato da absorção deste mineral ocorrer apenas na sua forma iônica (Grabov, 2007). O K^+ é eficientemente absorvido do solo pelas raízes, sendo que sua disponibilidade pode variar devido às condições ambientais e do solo. Em função disso, as plantas devem estar adaptadas às mudanças na concentração deste macroelemento (Pyo *et al.*, 2010), sendo que a existência de vários sistemas de absorção de potássio em raízes é vital para manter uma nutrição mineral adequada em um ambiente dinâmico (Grabov, 2007; Ashley *et al.*, 2006).

Assim a absorção de potássio envolve uma série de proteínas transportadoras, tais como os canais AKT (transportadores de potássio caracterizados em *Arabidopsis*), os transportadores HKT (transportadores de potássio de alta afinidade) e os transportadores HAK/KUP (transportadores de potássio de alta afinidade/ permeases de potássio) (Guo *et al.*, 2008).

Estudos clássicos em raízes de cevada descreveram os principais componentes de absorção de potássio que operam em baixa ou alta afinidade à concentração externa deste elemento. Assim, estes transportadores podem ser diferenciados de acordo com o seu mecanismo de ação: mecanismo I (sistema de transporte de alta afinidade), que atua em concentrações de até 18 μM de K^+ ; e mecanismo II (sistema de transporte de baixa afinidade), reconhecendo concentrações superiores a 16 mM (Epstain *et al.*, 1963). O mecanismo de alta afinidade demonstra ser induzido enquanto que o mecanismo de baixa afinidade mostra ser constitutivo (Fernando *et al.*, 1990). Todos os sistemas, incluindo os transportadores e os canais de potássio atuam em conjunto, para ajustar a absorção de alta afinidade de potássio nas raízes (Pyo *et al.*, 2010)

A membrana plasmática das células de raízes possui transportadores seletivos de potássio que asseguram o suprimento deste em diferentes condições, incluindo uma

ampla gama de concentrações externas de potássio bem como a presença de outros íons que interferem na absorção deste elemento (Martínez-Cordero *et al.*, 2005). Portanto, nas condições de baixas concentrações de potássio encontradas em muitos solos utilizados para agricultura, a atividade destes transportadores de alta afinidade é crucial para manter a produtividade.

Os transportadores KT/KUP/HAK possuem uma distribuição variável entre os genomas procarióticos. Tendo como base o banco de dados *Integrated Microbial Genomes* (IMG) (<http://img.jgi.doe.gov>), apenas 38% das espécies de bactérias possuem estes transportadores, enquanto que em Archaea (IMG, <http://img.jgi.doe.gov>) estes genes estão presentes em apenas duas, das vinte e quatro espécies analisadas (Grabov, 2007). Nos eucariontes, em análises realizadas em diferentes bancos de dados, ortólogos da família KUP foram encontrados nos reinos Plantae, Fungi e Amoebozoa (Grabov, 2007) (Figura 2).

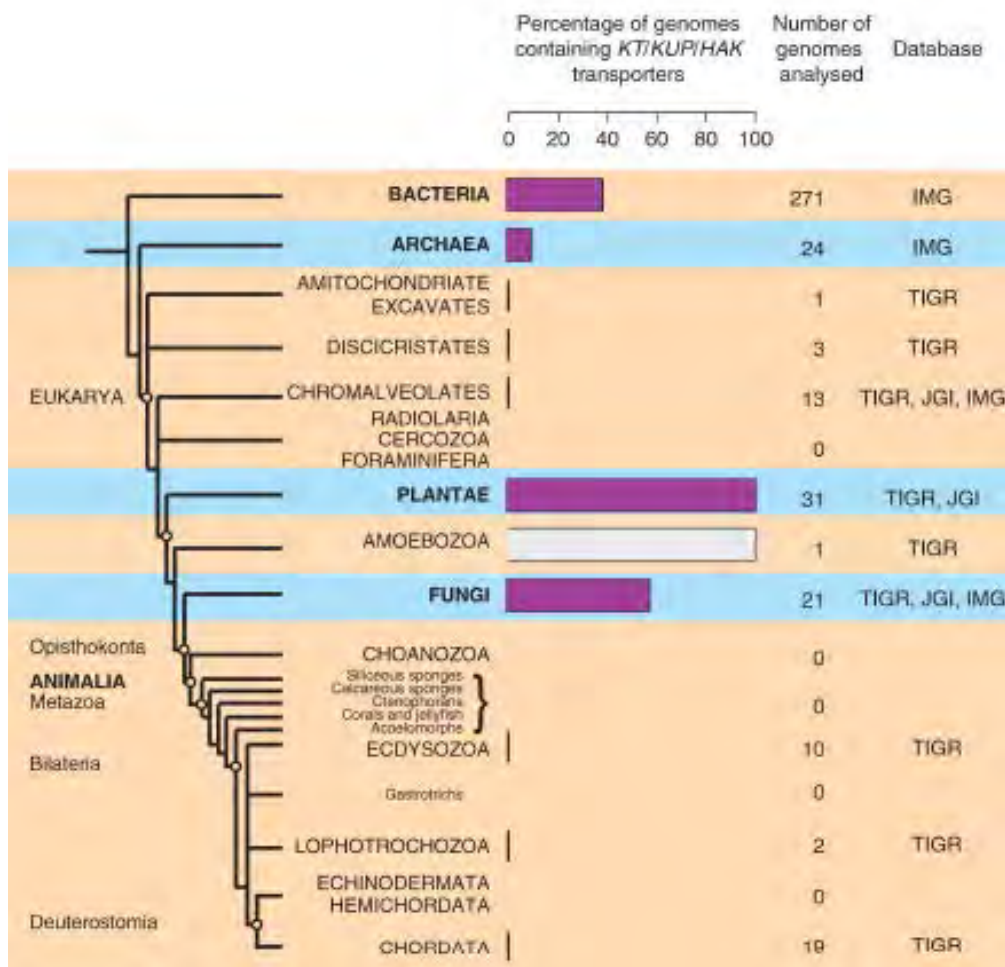


Figura 2- Distribuição e relação filogenética dos transportadores da família KT/KUP/HAK (Grabov, 2007).

A presença destes transportadores em plantas ocorre desde as algas verdes até as angiospermas, evidenciando a importante função na aquisição de nutrientes e a habilidade das plantas de sobreviverem em ambientes com deficiência em potássio (Grabov, 2007).

O primeiro sistema de alta afinidade de potássio foi caracterizado em cevada (*Hordeum vulgare*) na concentração de 18 μM , o qual não diferencia K^+ e Rb^+ (Epstein *et al.*, 1963). Estudos posteriores visando entender a regulação da absorção de potássio

em raízes de cevada mostraram que existe um aumento na absorção de alta afinidade quando o suprimento exógeno de potássio é interrompido (Glass, 1975).

A maior família gênica de transportadores de potássio em *Arabidopsis* é a família AtKT/KUP que contém 13 membros (Very *et al.*, 2003). Estes transportadores também foram previamente identificados em *Escherichia coli* como KUPs (K⁺ uptake permeases) (Schleyer *et al.*, 1993). Genes homólogos também foram identificados no fungo *Schwanniomyces occidentalis* e denominados HAKs (high affinity K⁺) (Banuelos *et al.*, 1995).

Estudos adicionais em plantas e microorganismos vêm demonstrando que estes transportadores possuem as mais variadas funções. A expressão dos genes da família KT/HAK/KUP é detectada em vários tecidos de diversas espécies (Kim *et al.*, 1998; Rigas *et al.*, 2001), e os membros desta família parecem estar envolvidos na absorção de potássio em raízes.

Um estudo realizado empregando linhagens de *Arabidopsis thaliana* com inserção de T-DNA no gene que codifica o transportador *AtHAK5*, por exemplo, demonstrou que este transportador atua como um sistema de alta afinidade de absorção de potássio em plantas (Nieves-Cordones *et al.*, 2010). O *AtHAK5* está localizado na membrana plasmática e é um dos principais componentes do sistema de absorção de potássio por alta afinidade nesta espécie (Qi *et al.*, 2008). Mutantes *athak5* mostraram uma redução na absorção de potássio em uma ampla faixa de concentração (Gierth *et al.*, 2005). Estudos adicionais combinando os efeitos de mutações e inibidores indicam que *AtHAK5* atua em associação com *AtAKT1*, e que estes constituem os únicos sistemas envolvidos na absorção de potássio em *Arabidopsis* (Rubio *et al.*, 2008). Entretanto, estes sistemas de absorção diferem entre si, já que *AtHAK5* é expresso na

falta de potássio (Gierth *et al.*, 2005, Rubio *et al.*, 2008) e *AtAKT1* é constitutivo. Portanto fica claro que a absorção de potássio de alta afinidade é mediada por transportadores enquanto que a absorção de baixa afinidade, em uma ampla faixa de concentração, é mediada por canais de potássio (Maathuis *et al.*, 1996). Cabe ressaltar ainda que *AtHAK5* é expresso primordialmente na epiderme das raízes principal e lateral, além de apresentar expressão vascular (Gierth *et al.*, 2005).

2. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- Caracterizar funcionalmente um promotor de eucalipto com expressão tecido–específica em raiz, previamente inserido em tabaco.
- Isolar e caracterizar a região promotora de um gene de eucalipto validado como apresentando expressão específica em folha.

3. Material e métodos

3.1. Análise funcional do promotor de raiz

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) contendo o cassete de expressão composto pelo promotor de raiz fusionado ao gene repórter *uidA* (que codifica a β -glucoronidase; GUS) (Figura 3) foram geradas por Ribeiro (2009) com o objetivo de realizar a caracterização funcional *in planta* do referido promotor. A identificação deste promotor foi baseada em um EST de eucalipto junto ao banco do FORESTS, sendo o mesmo validado como apresentando expressão específica em raiz (Ribeiro, 2009).

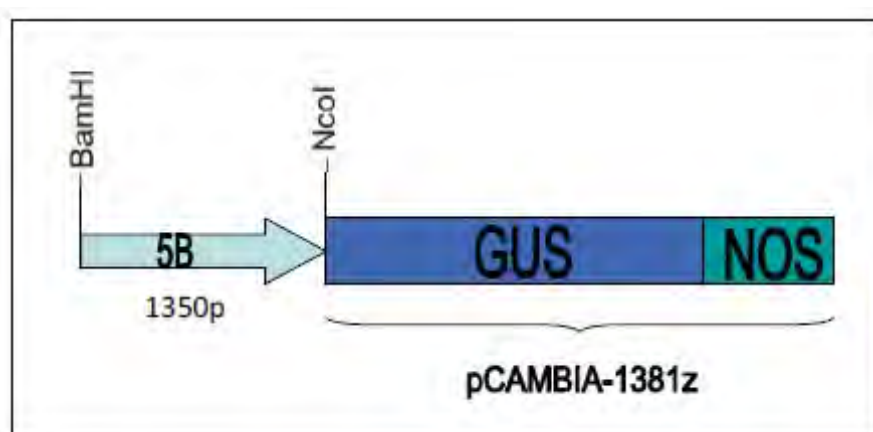


Figura 3 - Representação esquemática do cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz (5B) em fusão transcricional ao gene GUS inserido no vetor pCAMBIA-1381z. O terminador da nopalina sintetase está representado (NOS).

3.1.1. Elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor específico de raiz

Foram realizadas buscas por possíveis elementos regulatórios presentes na sequência de nucleotídeos do promotor específico de raiz. Para tal foi utilizando o banco de dados PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

3.1.2. Germinação das sementes de tabaco (T1) contendo o cassete de expressão do promotor específico de raiz fusionado ao gene *uidA* (GUS)

As sementes de tabaco das linhagens transgênicas 04, 06, 16 e 17 geradas por Ribeiro (2009) foram inicialmente embebidas em água Milli-Q por uma hora, sendo então colocadas em álcool 70% por 1 minuto e lavadas 2x em água Milli-Q autoclavada. Posteriormente, as sementes foram incubadas em hipoclorito a 70% por 20 minutos e lavadas 5x em água Milli-Q autoclavada. Para germinação, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) adicionado de Phytalgel 0,23% (Sigma). As placas foram mantidas durante quinze dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz artificial e temperatura de 22°C.

3.1.3. Ensaio Histoquímico de GUS

O ensaio histoquímico para detecção *in situ* da atividade GUS nas linhagens transgênicas 04, 06, 16 e 17 foi realizado baseado em Jefferson *et al.* (1987) e Lacorte & Romano (1998).

Para tal, as plântulas foram submersas no tampão fosfato contendo 1 mM do substrato halogênico X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide) que em contato com a enzima β -glucuronidase (GUS) torna-se azulado, infiltradas a vácuo e incubadas a 37°C no escuro por duas horas. Finalizado o tempo de reação, as plântulas foram submetidas a lavagens sucessivas em álcool 70% para retirada da clorofila (Jefferson *et al.*, 1987).

3.1.4. Cortes Histológicos

Cortes transversais e longitudinais (5 μ m) de amostras de raiz e folha das plântulas da linhagem 06 submetidas ao ensaio histoquímico foram obtidos em micrótomo para análise histológica da expressão de GUS. Para isto, os tecidos foram fixados em etanol 50%, ácido acético glacial 100% e formaldeído 37% por 24 horas. Em seguida o material foi desidratado nas seguintes etapas: etanol 70% por 2 horas, etanol 90% por 2 horas e etanol 100% por 2 horas, resina líquida (1:1) por 2 horas e resina ativada por 24 horas. Para a inclusão foram utilizados 1,6 ml de resina e 100 μ l de endurecedor.

3.1.5. Crescimento em solução hidropônica e indução de estresse

As sementes das linhagens 06, 16 e 17 foram esterilizadas e germinadas como citado anteriormente. Completados os quinze dias de crescimento, as plântulas de cada linhagem foram transferidas para solução nº2 de Hoogland e Arnon a 25% contendo 25,5 mg/l de N, 7,75 mg/l de P, 58,5 mg/l de K, 40 mg/l de Ca, 12 mg/l de Mg, 16 mg/l de S, sendo mantidas por 7 dias com aeração contínua. Passado esse período, as plântulas foram transferidas para uma solução nutritiva desprovida de potássio contendo 38,5 mg/l de N, 0 mg/l de K, 50 mg/l de Ca, 7,75 mg/l de P, 12 mg/l de Mg, 16 mg/l de S. Antes de tal transferência, entretanto, algumas plântulas foram coletadas para comporem o tempo zero (controle). Após a transferência para a solução sem potássio, as plântulas foram coletadas nos tempos de 12 e 24 horas e após 6 dias conforme descrito por Ahn e colaboradores (2004) em ensaios realizados com o transportador *AtHAK5*. Após a coleta realizada no sexto dia, as plântulas restantes foram novamente transferidas para solução nutritiva contendo potássio visando a sua recuperação, e uma última coleta foi realizada após 30 horas da reposição do elemento (Ahn *et al.*, 2004). A cada coleta, procedeu-se a separação da parte aérea e da raiz, sendo as amostras maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.1.6. Ensaio histoquímico de GUS em plântulas submetidas a estresse de K

O ensaio histoquímico para detecção *in situ* da atividade GUS foi realizado baseado em Jefferson *et al.* (1987) e Lacorte & Romano (1998) como descrito no item 3.1.3. Para tal, somente plântulas da linhagem 16 foram selecionadas. Nesse caso,

somente as plântulas correspondentes ao controle (tempo zero) e ao tempo de 6 dias sem potássio foram submetidas ao ensaio histoquímico de GUS.

3.1.7. Extração de RNA total de tabaco

Visando quantificar a expressão relativa do gene GUS sob o controle do promotor de raiz, procedeu-se a extração de RNA total através do método de Korimbocus *et al.* (2002) (baseado em Chang *et al.*, 1993) com modificações. Para cada coleta, as plântulas foram separadas em parte aérea e raiz, a fim de analisar a expressão de GUS separadamente. Foram utilizadas alíquotas de aproximadamente 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido, as quais foram solubilizadas em tampão de extração CTAB 5% e incubadas a 65°C por 15 minutos. Adicionou-se em seguida 500 µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e homogeneizou-se a solução. Centrifugou-se a 12000 g por 10 minutos a 4°C e coletou-se o sobrenadante. Uma nova extração com CIA seguida de centrifugação foi então realizada. Adicionou-se um volume de cloreto de lítio (LiCl 5 M) ao volume de sobrenadante e o RNA total foi precipitado por no mínimo 1 hora com posterior centrifugação a 12000 g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 200 µl TE-SDS 1%, 100 µl de NaCl 5 M e 300 µl de isopropanol. Procedeu-se então uma precipitação de 30 minutos a -20°C com posterior centrifugação a 12000 g por 20 minutos a 4°C. Foi realizada uma lavagem em etanol 70% com centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em água-Milli-Q autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato – DEPC).

A integridade do RNA total das amostras foi analisada em gel desnaturante a 1% corado com brometo de etídio.

Para a produção de cDNAs, alíquotas de 1 µg de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I segundo as recomendações do fabricante (MBI Fermentas), visando degradar todo o DNA genômico presente nas mesmas. Após o tratamento com a DNase, cada alíquota foi submetida a transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* conforme as instruções do fabricante (Applied Biosystems). Com o auxílio do espectrofotômetro, a concentração das amostras de cDNA foi ajustada para 60 ng/ul e empregada na reação. O reagente utilizado na reação foi o *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) e os oligonucleotídeos gene-específicos foram desenhados no programa “Primer Express” (Applied Biosystems). O aparelho *ABI PRISM 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) foi utilizado como plataforma para a qPCR.

A expressão relativa do gene *uidA* (GUS) nas plântulas submetidas ao estresse e coletadas nos tempos anteriormente citados foi determinada utilizando os oligonucleotídeos qRTGUSF (5' TCTACTTTACTGGCTTTGGTCG 3') e qRTGUSR (5' CGTAAGGGTAATGCGAGGTAC 3'). A quantificação relativa foi determinada empregando o método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), e calculada com base na expressão de um gene normalizador [fator de alongamento de tabaco - primers EFF (5' TCT GAT CCA TTG TTG GAT GCT GG 3') e EFR (5' TTC AAA CCC TTC CTC TTG CG 3')]. Com o intuito de verificar a efetividade do estresse de K foi utilizado o gene *NrHAK1* de *Nicotiana rustica* (Primers NT841950F 5'GCAGAGGATATTCAACATTCAG3' e NT841950R

5'CCACCTTCACCATTATCATCAG3'), que responde a baixas concentrações de potássio. A seguinte equação foi utilizada para o cálculo da expressão relativa:

$$ER = 2^{-\Delta Ct}$$

Onde:

ER= expressão relativa

$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene normalizador}}$

Ct= "Threshold cycle", ciclo em que a fluorescência do alvo se torna significativamente maior que o ruído ("background")

Na reação foram utilizados 6,25 μl de *Syber Green Mix*, 10 mM dos oligonucleotídeos (senso e reverso), 1 μl de cDNA (60 ng/ μl) e água deionizada autoclavada para completar um volume de 12,5 μl . Empregou-se um ciclo prévio de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguido de um ciclo de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento e extensão a 60°C por 1 min, repetido por quarenta vezes. Ao final da reação adicionou-se um passo de dissociação através do aquecimento de 60°C para 95°C, subindo 1°C por min. Este procedimento serviu para verificar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados ou a formação de *primers dimers*.

3.1.8. Expressão transiente em eucalipto

3.1.8.1. Construção do cassete de expressão no vetor pPR97

Para realizar os ensaios de expressão transiente em eucalipto, o cassete de expressão contendo o promotor em estudo fusionado ao gene GUS, inicialmente inserido no vetor binário pCAMBIA-1381-z, foi transferido para o vetor pPR97 (Figura 4) que possui resistência a canamicina (pré-requisito para uso em cultura de células de eucalipto).

Inicialmente 1000 ng do vetor pCAMBIA contendo o promotor foram tratados com 1 µl da enzima de restrição *Nco*I (10 U/ µl). A amostra foi incubada a 37°C por 1 hora e 30 minutos, seguida de inativação da enzima a 65°C por 15 minutos. Uma alíquota do DNA plasmidial digerido foi verificada em gel de agarose 1% para confirmar a linearização do mesmo. A amostra foi então tratada com 0,5 µl da enzima T4 DNA polimerase (4 U/µl) a 37°C por 30 minutos. Para exacerbar a atividade exonuclease da enzima, necessária para a retirada do ATG iniciador do gene *uidA*, a reação em questão foi realizada sem a adição de nucleotídeos. Logo após, um novo tratamento com 0,5 µl da enzima T4 DNA polimerase (4 U/ul), desta vez em presença de 0,5 µl de dNTPs (10 mM), foi realizado para que a enzima adicionasse nucleotídeos resultando em uma extremidade cega. O DNA foi então digerido com 1 µl da enzima de restrição *Bam*HI (10 U/ul), submetido a eletroforese e purificado do gel utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification GE* sendo então quantificado com o auxílio de espectrofotômetro (Nanodrop). A ligação do fragmento promotor ao vetor foi realizada utilizando 100 ng do vetor pPR97 digerido com *Bam*HI e *Sma*I, 100 ng do fragmento promotor digerido com *Nco*I (com extremidade cega) e *Bam*HI, 5 µl de

tampão 10X, 2 µl da enzima T4 ligase (5U/µl) e água para completar 50 µl. A reação foi mantida por 22°C por 16 horas. Após a ligação, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* conforme descrito nos itens a seguir.

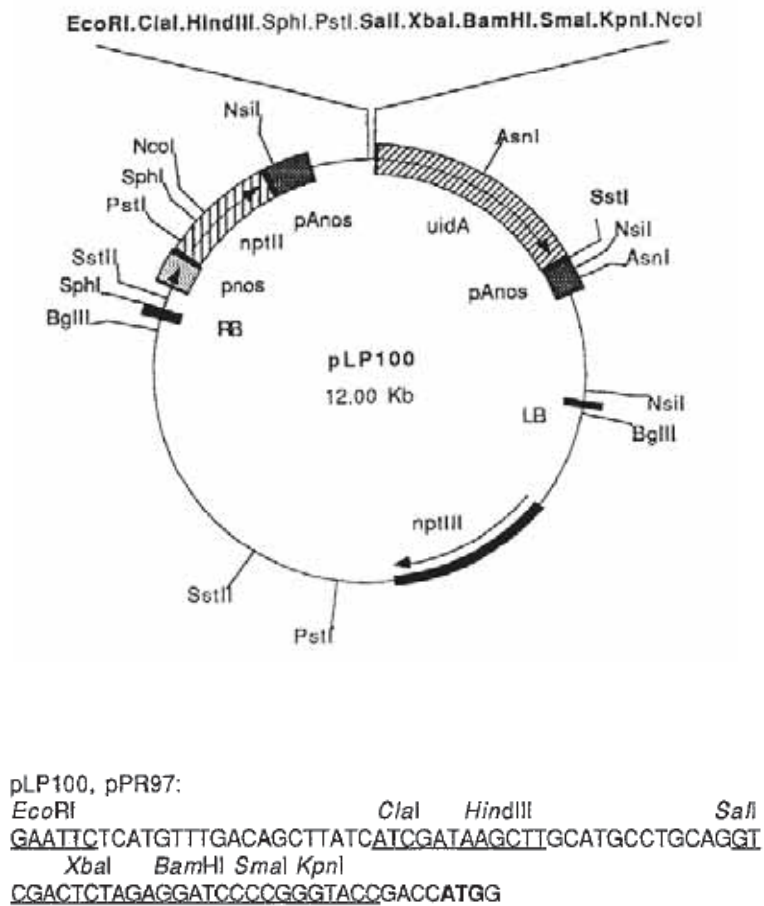


Figura 4 - Representação esquemática do vetor pPR97 (Szabados *et al.*, 1995).

3.1.8.2. Produção das células competentes de *Escherichia coli* DH10B

Células competentes da linhagem DH10B de *Escherichia coli* foram produzidas conforme protocolo (Sambrook *et al.*, 1989). Para tal, uma colônia isolada foi inoculada em 5 ml de meio LB líquido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl em água deionizada, pH 7,0) e incubada sob agitação (220 rpm) a 37°C por 16 horas. Dois ml desse pré-inóculo foram então usados para inocular 200 ml de meio SOB (Triptona 1 M, Extrato de levedura 2%, NaCl 1 M, KCl 1 M) adicionado de 2 ml de MgCl₂ (1 M) e 2 ml MgSO₄ (1 M). As bactérias foram mantidas sob agitação (220 rpm) a 37°C por 1 hora e 30 minutos até atingir a absorbância a 600 nm igual a 0,6. O meio contendo as bactérias foi então aliqotado em tubos de 50 ml, e os mesmos foram incubados em gelo por 10 minutos, após o qual se seguiu uma centrifugação a 3600 rpm a 4°C por 10 minutos. Ao precipitado foi adicionado 15 ml de tampão RF1 (KCl 1 M, MnCl₂·4H₂O 1 M, KAC 0,5 M pH6,9, CaCl₂·2H₂O 1 M, glicerol, 15%) seguido de agitação em vórtex e incubação no gelo por 10 minutos. Após centrifugação a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos, o sedimento foi ressuspensão em 8 ml de tampão RF2 (NaMOPS 0,5 M pH7, KCl 1 M, CaCl₂·2H₂O 1 M, glicerol 15%), agitado em vórtex e incubado no gelo por 30 minutos. Alíquotas de 100 µl foram armazenadas em microtubos, os quais foram resfriados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer - 80°C.

3.1.8.3. Transformação do cassete de expressão em células DH10B

Para transformação, 10 µl da ligação vetor/inserto foram adicionados a 100 µl de células DH10B competentes e uma incubação em gelo por 30 minutos foi realizada. Em seguida foi realizado o choque térmico a 42°C por 90 segundos. Duzentos µl de meio SOC foram adicionados ao tubo, e uma incubação a 37°C por 1 hora a 250 rpm foi realizada. Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido adicionado de 25 µl de canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Para confirmação da transformação, colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido a 37°C por 20 horas, e após a extração dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), os mesmos foram submetidos à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos internos, sendo um promotor-específico (senso) denominado EGRTconF, e outro (reverso) complementar à região codificadora do gene *uidA* (GUS). O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1%.

Para confirmação adicional, os plasmídeos recombinantes também foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI*. Os produtos da digestão foram analisados em gel de agarose 1%.

3.1.8.4. Sequenciamento

Os clones recombinantes foram sequenciados para verificação. Para tal, foram utilizados 500 ng do produto do PCR confirmatório, sendo a reação realizada empregando o kit comercial “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems). O oligonucleotídeo utilizado no sequenciamento foi o GUS reverso (5’

GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC 3') desenhado no programa "Primer Express" (Applied Biosystems). O aparelho utilizado foi ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.1.8.5. Transformação de Agrobactéria por Eletroporação

A transformação de *Agrobacterium tumefaciens* foi baseada no método descrito por Lacorte & 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 Canamicina (100 mg/ml). As placas foram então incubadas a 28°C por 3 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), 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%.

3.1.8.6. Expressão Transiente em eucalipto

O ensaio de expressão transiente em eucalipto será realizado em colaboração com a empresa Suzano Papel e Celulose. Para tal será utilizada a metodologia SAAT (*sonication-assisted Agrobacterium mediated transformation*) conforme protocolo adaptado para eucalipto por González (2002). Nesse método, microferimentos são provocados nos explantes de eucalipto por sonicação (60 s) a fim de aumentar a penetração da agrobactéria no tecido vegetal. Nesse caso serão usadas plântulas de eucalipto obtidas *in vitro*. Quarenta e oito horas após a infecção das plântulas de eucalipto pela agrobactéria contendo o cassete de expressão em pPR97, as mesmas serão submetidas ao ensaio histoquímico empregando o substrato X-Gluc.

3.2. Identificação do EST com expressão específica em folha de eucalipto

3.2.1. Identificação do EST com expressão específica em folha

O EST com expressão específica em folha foi selecionado em análises *in silico* realizadas junto ao banco de dados FORESTs (https://forests.esalq.usp.br/FORESTs_About.htm) que é composto por ESTs oriundos do sequenciamento de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA extraído de vários órgãos/tecidos de eucalipto em condições normais e sob diferentes estresses. A identificação do EST candidato foi realizada comparando-se os ESTs oriundos da biblioteca de folha com os ESTs presentes nas bibliotecas dos demais órgãos/tecidos de eucalipto conforme descrito (Vicentini *et al.*, 2005). O EST EGJFLV3247C08. G, com padrão de expressão em folha, foi selecionado para posterior validação biológica.

Após a fase de seleção *in silico*, com o intuito de validar a especificidade da expressão do candidato selecionado, pares de oligonucleotídeos foram desenhados tendo como base a sequência de nucleotídeos do EST depositada no banco FORESTs. Para tal foi usado o programa “Primer Express” (Applied Biosystems) seguindo os seguintes critérios: tamanho do oligonucleotídeo (mínimo: 18 bases; ótimo: 20 bases; máximo: 25 bases); temperatura de anelamento (mínimo: 57°C; ótimo: 60°C; máximo 66°C); e conteúdo em GC (mínimo: 40%; ótimo: 50%; máximo: 60%).

3.2.2. Validação da expressão por RT-PCR

Para a validação por RT-PCR, 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 (CTAB 2%, PVP 2%, Tris HCl pH 8 100 mM, NaCl 2M) pré aquecido e incubação 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.

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 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.

3.2.3. Isolamento da região promotora do EST EGJFLV3247C08.g com expressão específica de folha

Após a validação da expressão do EST candidato em folha, o promotor correspondente foi amplificado empregando o protocolo de *genome walking* (GW) originalmente descrito por Devic *et al.* (1997). Para tal foi empregado o kit *Universal GenomeWalker* (BD Biosciences - Clontech).

Bibliotecas foram constituídas a partir de 4 pools de fragmentos oriundos da digestão de DNA genômico de eucalipto (item 3.2.4) com diferentes enzimas de restrição de corte abrupto (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*). Esses fragmentos foram então ligados a adaptadores fornecidos pelo kit.

Na amplificação foram usados, além dos oligos complementares aos adaptadores, dois oligonucleotídeos gene-específicos (GSP1 e 2) complementares à porção 5' terminal da sequência do EST validado, de maneira a permitir a amplificação de produtos situados à região montante deste. Os seguintes critérios foram adotados para o desenho dos oligos GSP: 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%).

3.2.4. Extração de DNA genômico de Eucalipto

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 (CTAB 2%, PVP 1%, Tris-HCl pH8 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, 0,2 2-mercaptoetanol) 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.

3.2.5. Construção das bibliotecas GW

As bibliotecas foram produzidas a partir de 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. Após a ligação dos adaptadores, as amplificações das seqüências promotoras foram realizadas conforme especificações do kit.

3.2.6. Clonagem e sequenciamento do produto de amplificação

O produto gerado na amplificação por *Genome Walking* foi isolado em gel de agarose 1% e purificado. Esse produto foi clonado no vetor pGEM-Teasy (Promega) e transformado em *Escherichia coli* cepa DH5α (Sambrook *et al.*, 1989). Os plasmídeos recombinantes foram extraídos por lise alcalina e uma digestão com *EcoRI* foi realizada para verificar a presença do fragmento clonado, descartando os clones com falsos positivos. Os transformantes validados foram crescidos em 1,5 ml de meio LB líquido, em seguida foi adicionado glicerol líquido autoclavado (15%; v/v) para posterior estocagem em freezer -80°C.

A reação de sequenciamento foi realizada com um kit comercial de “Big Dye” versão 3.1 (Applied Biosystems) empregando os oligonucleotídeos T7 senso e antisenso SP6. Como molde foi utilizado o DNA plasmidial contendo o produto de PCR derivado

do GW. As reações de sequenciamento foram realizadas em seqüenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

3.2.7. Construção do cassete de expressão

Para a análise funcional do promotor com expressão em folha foi realizada a construção do cassete de expressão utilizando o vetor pCAMBIA 1381-z. O fragmento promotor foi amplificado por PCR visando a adição dos sítios *Bam*HI e *Nco*I. O sítio *Nco*I permite a inserção correta do promotor em fusão transcricional com o gene GUS presente em pCAMBIA 1381-z. Após a digestão com as referidas enzimas, o produto de amplificação foi purificado em gel de agarose utilizando o *Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen) e inserido no vetor pCAMBIA 1381-z igualmente digerido e purificado.

Após a ligação, células competentes da cepa DH10B de *Escherichia coli* (preparadas conforme protocolo descrito anteriormente) foram transformadas empregando choque térmico. Após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido adicionado de 100 µg/ml de higromicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Para confirmar a presença do fragmento inserido no referido vetor, os plasmídeos recombinantes foram purificados por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) e submetidos à digestão com as enzimas de restrição usadas na clonagem (*Nco*I e *Bam*HI) com posterior análise do produto de digestão em gel de agarose 1%. Uma reação de PCR confirmatória utilizando os oligonucleotídeos CLNcoI (5' CATGCCATGGATAGTATCGTTGCAGT 3') e CLBamHI (5' CGCGGATCCCTTAAATTTGCCCATG 3') foi adicionalmente realizada.

O cassette de expressão obtido foi sequenciado conforme descrito no subitem D do item 3.1.8 empregando um seqüenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

4. Resultados

4.1. Análises do Promotor de Raiz

4.1.1. Elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor

Com a busca por elementos *cis*-regulatórios foi possível observar que além de elementos gerais comumente encontrados em promotores como o TATA Box (realçado em preto) e o CAAT box (realçados em verde), observou-se a presença de uma sequência *cis*-regulatória implicada na resposta a metil jasmonato (realçada em azul) bem como de outros elementos relacionados com a resposta ao ácido abscísico (marrom), ácido salicílico (amarelo) e etileno (laranja) (Figura 5).

```

>userseq27092 1348nt
-1295 + CTATAGGGCA CGCGTGGTCG ACGGCCCGGG CTGGTATAAC GTGAAGAT 2 TGGTATACT TTGTTGTAGT
- GATATCCCGT GCGCACCAGC TGCCGGGCCC GACCATATGG CACTTCTAGT TACCATATGA AACAACTCA

-1225 + GTGATAGTTT GAAATGTTTG GAGTAAGCGA TTGAACAAGA TATTAACTCA AAGTAGGGAA AGCTTTCTAA
- CACTATCAA CTTTAAAC CTCATTCGCT AATTGGTCT ATAATGAGT TTCATCCCTT TCGAAAGATT

-1155 + TTACGCATAA TTTACGCTAT TAGAAAAATC ATATAATTTT ATCTCTTATG AAACCAAAA TGAAAAAAC
- AATGGGTATT AAATGGGATA ATCTTTTTAG TATATTAATA TAGAGAAATAC TTGGGTGTTT ACTTTTTTTG

-1085 + ACGATACATT CTCTCTCTAT ATGTCAATGT CATTTAATTT TTAANAACAAG GACAAAGAAA AGGGGGAAAA
- TGCTATGTAA GAGAGAGATA TACAGTTACA GTAAATTAAT AATTTTGTTC CTGTTTCTTT TCCCCTTTT

-1015 + CAITTTTTTG GGGGGGAGCG GCGATGATTA TTGGGGCCGG CACGTAAGAT COCTAGAGAA TAGCTCAATC
- GTAAAAAAC CCCCCTGCG CGCTACTAA AACCCGGCC TCTA GGGATCTCTT ATCGAGTTAG

-945 + AATCACAGTT AATTAATTTT GATAAAATAA TTTCATATAA TAACATGAAG TGGGGCCTTT TTCCAAAAT
- TTAGTGTCAA TTAATTAATA CTATTTTATT AAGTATATT AITGTACTTC ACCCCGGAAA AAGGTTTTTA

-875 + ATAACTAAAA ATGGACTTCG TCCTAGATAA AGTCTTGAAG AGCATAATT AATCTAAAT AAGACCTTAA
- TATTGATTTT TACCTGAAGC AGGATCTATT TCAGAATTC TCCGTTTAAA TTAGAGTTTA TTCTGGAATT

-805 + ATTGACAAGC CGACCAAAAC TTCCTAGTGC GATGAACATG TGTGACTCAC AGGACGCTTG GCRAAACATG
- TATGTGTTTG GCTGGTTTTG AAGTGATCAG CTACTTGTAC ACACTGAGTG TCTCGGAAC CGTTTTGTAC

-735 + ACTAGGGCAT TTTCAITCAG AAATATTTTC TTCTTTTTCT TTCTTCTTCC TTCCGCAATC ATGTAAGTTT
- TGATCCCGTA AAAGTAAGTC TTTATAAAAG AAGAAAAGA AAGAAGAAGG AAGCCGTAG TACATTCAA

-665 + CGTGTCTCT TTGTCTGACC GGGCAAACTA AGTTTGTCTT TTGAAAATAT TATTTGAGAC AAGATTGCT
- GCACACGAGA AACAGACTGG CCGTTTTGAT TCAAACAGT AAGTTTTATA ATAAATCTTG TTCTAAAGCA

-595 + CTTGATCTC TTTTGAAGAA AGACCCCAA TAAAGTTAT TACTCAACGT TTTCCCGGGG TTCTACCTTT
- GAAC TGGAG AAAAC CTTT TCTGGGGGTT AATTTCAATA ATGAGTTGCA AAAGGGGCC AACATGGGAA

-525 + AGCTGTGATC AACCTGCACT TTTCTTATT GGCTTTCTT TCTTCTTCT GAATAGAACC TTGGAACATA
- TCGACACTAG TTGAACGTGA AAAGGAATA CCGAAGAA AGAAGAAGA CTTATCTTGG AACCTTGATT

-455 + GAAAAATACA TGTCAATTAT GGAACCGCCC CTTAAAGGAA AGGGGAAAA AAATGTAGTT AATAGTAGTT
- CTTTTTATGT ACAGTAATA CTTTTGGGG GAATTTCTT TCCCCTTTT TTACATCAA TTATCATCAA

-385 + AAATTAGTAA GAGATAAGTT TAGACAGTTG ACTCATGAGA AAGTACATAG TTAATCTAT CTCAGCTAGC
- TTTAATCATT CTCTATTCAA ATCTGTCAAC TGAGTACTCT TTCATGTATC AATTTAGATA GAGTCGATCG

-315 + ATATGTGGAA AGCGACAAAA GCGGCAACT TGCCAAGTGG ACCGATGGGG OCTAGTCACC TGAATAGAAA
- TATACACCTT TCGCTGTTTT CCGCCGTTGA ACGGTTGAGC TGGCTACCCC GGATCAGTGG ACTTATCTTT

-245 + TCTTTATAC TGATCCTATA AGCGAAACAA ACACGTCTCA CCGACAAAA AAAAAAAGT CAATTTTTT
- AGGAAATATG ACTAGGATAT TCGCTTTGTT TGTGCMGAGT GGCTGTTTT TTTTTTTTCA GTTAAAAAA

-175 + GAGATAACA AACCTCAATG ATCACCTTTT TTTCCATTA AACAGTTCCG ACGATTTGTA CAGCCGATG
- CTCTATTTGT TTGGAGTTAC TAGTGGAAA AAAGGTAAT TTGTCAAGG TGTAAATAT GTCGCTTAC

-105 + TCGGGTTAAA GGTCAAGAC TCTCGAAGCT TATAAATG CCGAACCATC CCTTCACGTT GAGAGAAAG
- ACGCCAATTT CCACTCTCTG AGAGCTTCGA GATATTTAC GCTTGGTAG GGAAGTGCAA CTCTCTTTC

-35 + AACAGAGCGA AAAAAGGCGG GCGAGGAGGA AAAAATGCG GAGAGGGAAG GTGGTGGCCG TGGAGGAAGA
- TTGTCTGCT TTTTCCGGC CGCTCTCTCT TTTTAAAG CCTCTCTTC CACCACCGCG ACCTCCTTC

+ AGAAGAGTCA GAGATCA
- TCTTCTCAGT CTCTAGT

```

Figura 5- Distribuição dos principais elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor isolado de eucalipto a partir de EST apresentando expressão em raiz (~1350 pb). O potencial TATA Box está realçado em preto. O CAAT Box está amostrado em verde. O elemento regulatório relacionado à resposta a ácido abscísico está realçado em marrom, o elemento relacionado à resposta a metil jasmonato está azul, o elemento relacionado ao ácido salicílico em amarelo e o elemento relacionado à resposta a etileno em laranja. O ATG iniciador está realçado em vermelho.

4.1.2. Ensaio histoquímico

Para verificar a especificidade da expressão determinada pelo promotor em estudo, sementes das linhagens transgênicas 04, 06, 16 e 17 (geração T1) representando eventos independentes foram germinadas, e após 15 dias, as plântulas foram submetidas ao ensaio histoquímico de GUS. Como é possível observar na Figura 6, a presença de coloração azulada relativa à reação da enzima β -glucuronidase com o substrato X-Gluc foi detectada majoritariamente no tecido vascular de folhas e raízes de todas as linhagens transgênicas analisadas. No referido ensaio, plântulas contendo um cassete de expressão com o gene repórter GUS fusionado ao promotor constitutivo 35S foram usadas como controle positivo (Fig. 6, L e M).

Para confirmar a presença da atividade GUS em feixe vascular, cortes histológicos de raízes e folhas foram realizados. Como o padrão geral de localização da atividade histoquímica de GUS foi semelhante em todas as linhagens analisadas (Figura 6), optou-se nesse caso por se usar somente a linhagem 6 (geração T2). Como esperado, a presença da coloração azulada correspondente à atividade do gene repórter foi observada especificamente no feixe vascular de raiz e folha (Figura 7), corroborando, portanto, os resultados observados em plântulas inteiras.

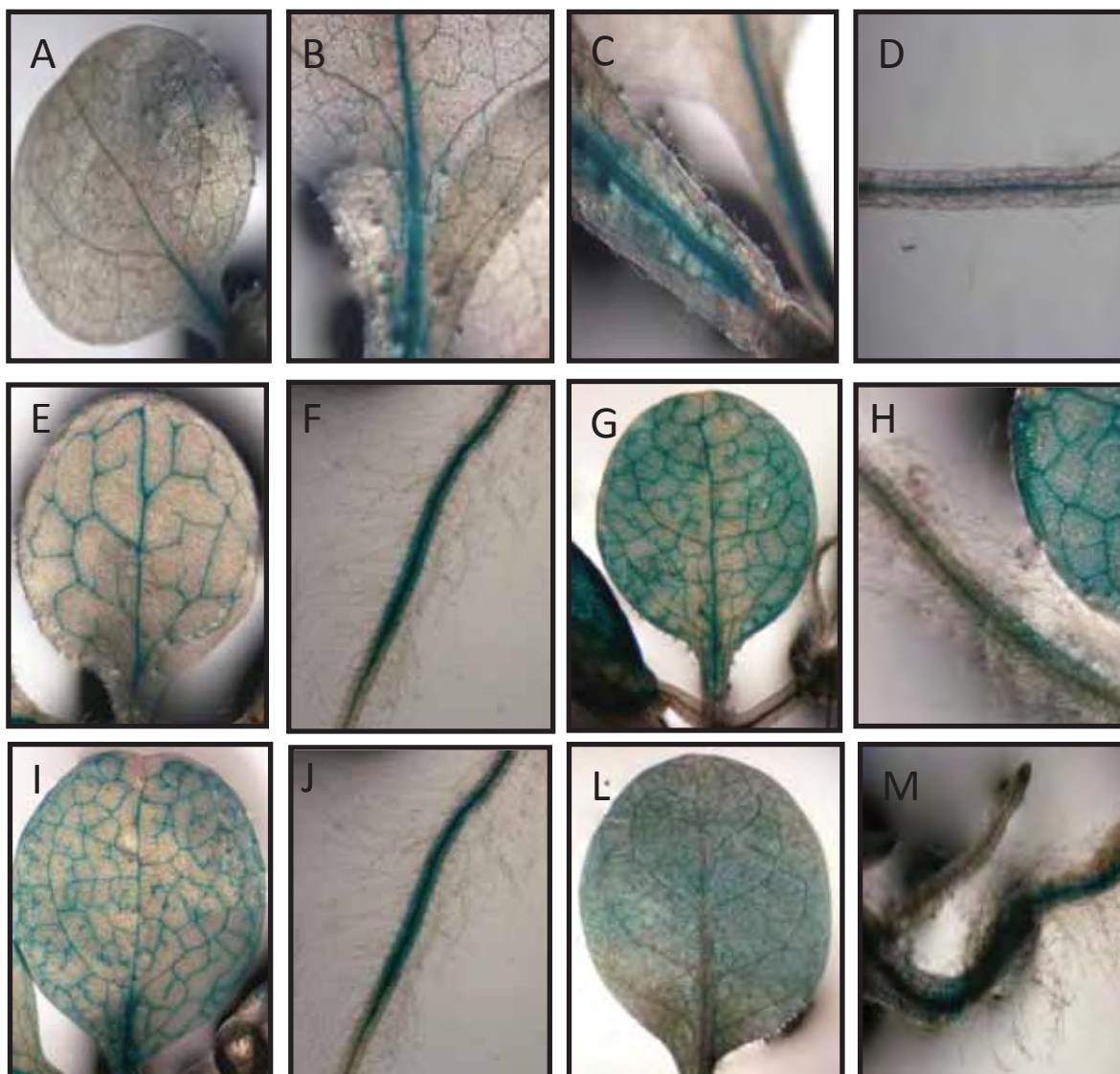


Figura 6 – Detecção histoquímica da atividade GUS em diferentes linhagens de tabaco transgênico contendo o promotor de raiz. **A ,B, C e D)** Folha e raiz de plântula representativa da linhagem 06. **E e F)** Folha e raiz de plântula representativa da linhagem 17. **G e H)** Folha e raiz de plântula representativa da linhagem 04. **I e J)** Folha e raiz representativa da linhagem 16. **L e M)** Controle positivo – folha e raiz de plântula transformada com o cassete de expressão contendo o promotor constitutivo 35S.

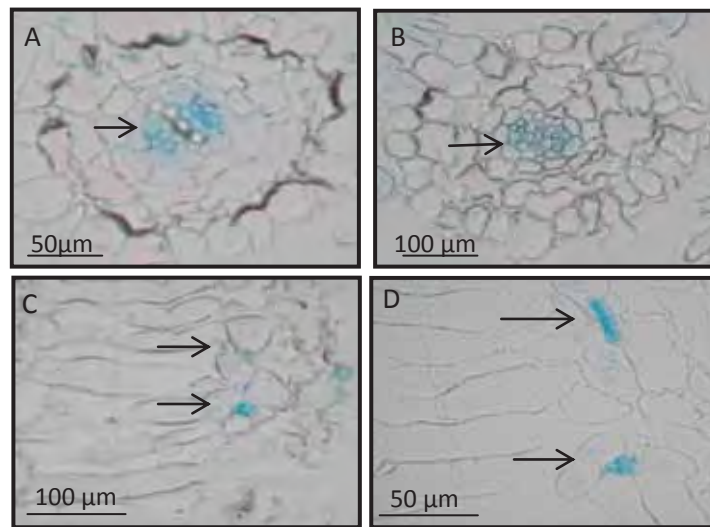


Figura 7 – Detecção da atividade GUS em feixes vasculares de tabaco transgênico contendo o promotor investigado (linhagem 6). As setas indicam os feixes vasculares em cortes de raiz (A e B) e folha (C e D).

4.1.3. Ensaio histoquímico em plântulas submetidas a estresse de K

Como realçado anteriormente, o gene cujo promotor foi clonado codifica um transportador de potássio de alta afinidade que apresenta similaridade com o transportador *AtHAK5* de *Arabidopsis thaliana*. A expressão de *AtHAK5* é induzida em baixas concentrações de potássio (Ahn *et al.*, 2004). A fim de investigar a ocorrência de uma possível expressão raiz-específica induzida pela exposição à baixa concentração de potássio, ensaios histoquímicos foram realizados empregando plântulas da linhagem 16 cultivadas em solução hidropônica na presença (tempo zero) ou ausência de potássio

(por 6 dias). Como é possível observar nos painéis A e B da Figura 8, a presença de coloração azulada relativa à reação da enzima β -glucuronidase com o substrato X-Gluc foi mais intensa nas raízes das plântulas submetidas ao estresse de potássio se comparada ao controle não estressado (tempo zero), evidenciando uma expressão exacerbada nesse órgão. Esses dados parecem sugerir que o promotor em estudo é mais ativo quando a disponibilidade de potássio é reduzida. Dados da quantificação da expressão de GUS por RT-qPCR corroboram os resultados observados nos painéis A e B da Figura 8, indicando que a expressão de GUS é maior em raízes submetidas a 6 dias de privação de potássio se comparada com o controle não estressado (tempo 0 h; Painel C, Figura 8). Já nas folhas, a expressão de GUS permanece praticamente inalterada.

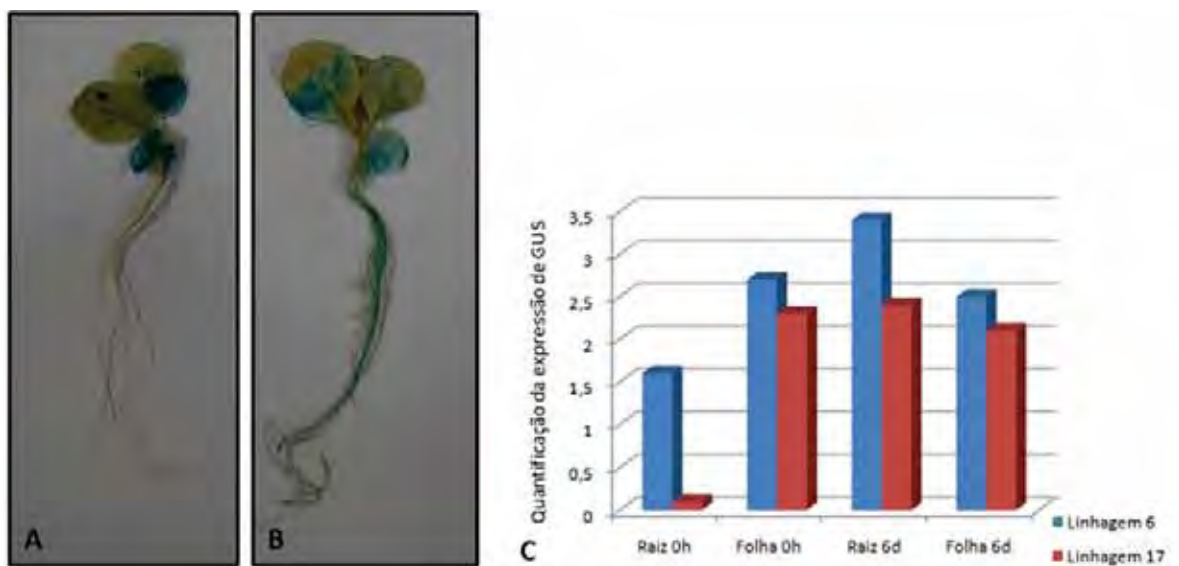


Figura 8 – Ensaio histoquímico de GUS em plântulas mantidas na presença ou ausência de potássio. **A)** Plântula transgênica mantida na presença de potássio (tempo zero). **B)** Plântula transgênica coletada 6 dias após retirada do potássio da solução. Somente uma plântula representativa de cada coleta está sendo apresentada. **C)** Quantificação da expressão do gene GUS em raízes e folhas das linhagens 6 (azul) e 17 (vermelho)

submetidas a 6 dias de privação de potássio. O tempo de 0 h representa plântulas em presença do elemento.

4.1.4. Análise da expressão relativa do gene GUS por RT-qPCR

Com o objetivo de investigar de forma mais aprofundada a regulação do promotor sob condições de baixa concentração de potássio, novos ensaios biológicos foram realizados utilizando as linhagens transgênicas 6 e 17 (geração T2). Nesse caso, determinou-se a expressão relativa do gene GUS em plântulas das referidas linhagens submetidas à falta de potássio, e coletadas em diferentes tempos (após 12 h, 24 h e 6 dias), e após recuperação em presença do elemento (30 h). Esses tempos foram estabelecidos com base no trabalho de Ahn *et al.*, (2004) para o gene *AtHAK5*. Cabe ressaltar que os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e que o tempo zero correspondeu ao controle sem tratamento.

Para a quantificação relativa foram utilizadas amostras de RNA total extraído de raiz e folha, separadamente, e um gene endógeno que codifica um fator de alongamento foi utilizado como normalizador. Pelos resultados obtidos (Figura 9) é possível observar que a expressão do gene repórter em raízes da linhagem 6 aumentou gradualmente com a retirada do potássio da solução hidropônica, sendo um pico de expressão detectado aos 6 dias. Porém, com a reposição do elemento, uma diminuição na expressão relativa foi constatada. O mesmo padrão geral foi observado para a linhagem 17. Nesse caso, entretanto, a expressão começou a aumentar a partir de 12 h, permanecendo constante em 24 h, e sofrendo um pequeno incremento 6 dias após a retirada do potássio. Com a

reposição do potássio, observou-se uma queda na expressão se comparada aos tempos de coleta na ausência do elemento.

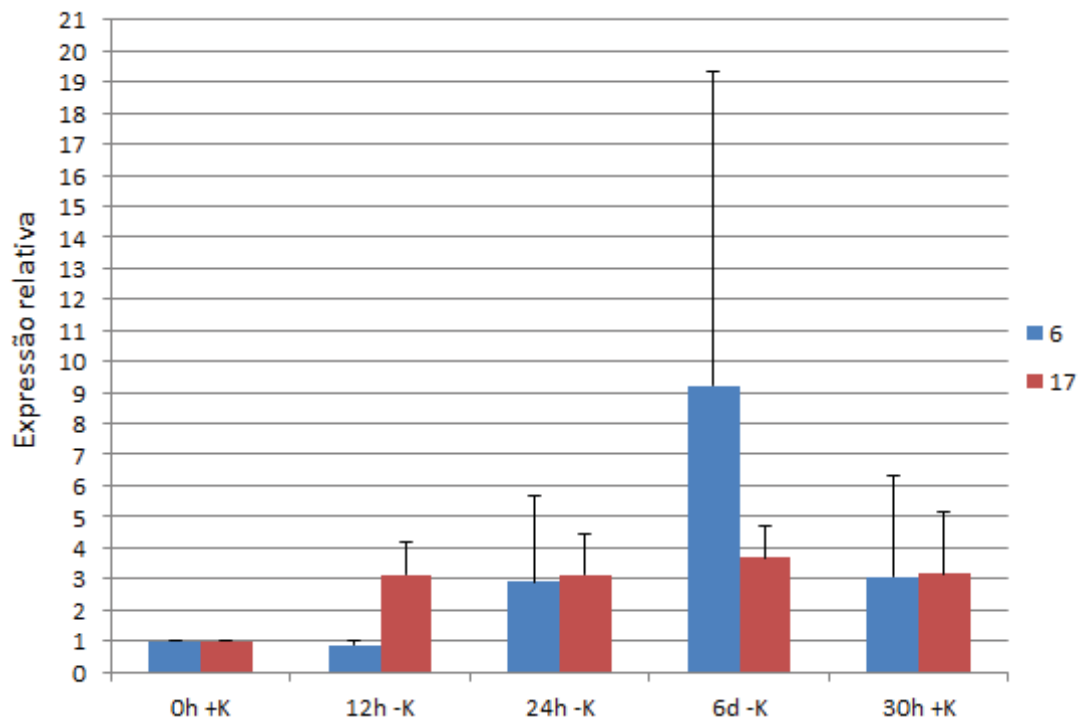


Figura 9- Análise da expressão relativa do gene GUS em raízes das linhagens transgênicas 6 (azul) e 17 (vermelho). As barras correspondem à média e respectivos desvios para três repetições independentes. (+ K – presença de K^+ ; -K – ausência de K^+).

Como a expressão do gene repórter foi detectada histoquimicamente em folhas (Figura 6), optou-se por quantificar a expressão relativa de GUS também neste órgão. Em folha das duas linhagens analisadas (Figura 10) não foi possível observar o mesmo padrão da raiz. Neste caso, foi constatado um aumento significativo em 12 h após a privação de potássio, seguido de uma diminuição em 24 h e 6 dias, havendo ainda um aumento da expressão relativa 30 h após a reposição do elemento.

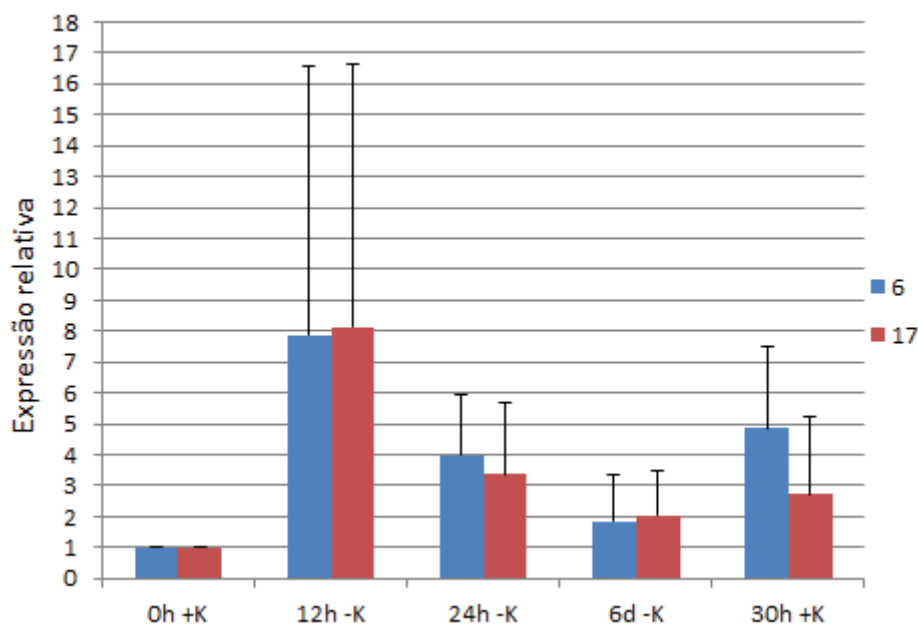


Figura 10- Análise da expressão relativa do gene GUS em folhas das linhagens transgênicas 6 (azul) e 17 (vermelho). As barras correspondem à média e respectivos desvios para três repetições independentes. (+ K – presença de K^+ ; -K – ausência de K^+)

Com o objetivo de analisar a efetividade do estresse de potássio, a expressão relativa de um gene de tabaco conhecidamente responsivo a baixas concentrações de potássio (*NrHAK1*; GUO *et al.*, 2008) foi avaliada em paralelo. Na Figura 11 é possível observar que uma expressão do referido gene em resposta à baixa concentração de potássio pode ser detectada nas raízes das duas linhagens analisadas. Na linhagem 17 houve um gradual aumento na expressão do gene *NrHAK1* a partir de 12 h. Por outro lado, na linhagem 6 houve um ligeiro aumento na expressão relativa de *NrHAK1* que só pode ser detectado 6 dias após o estresse.

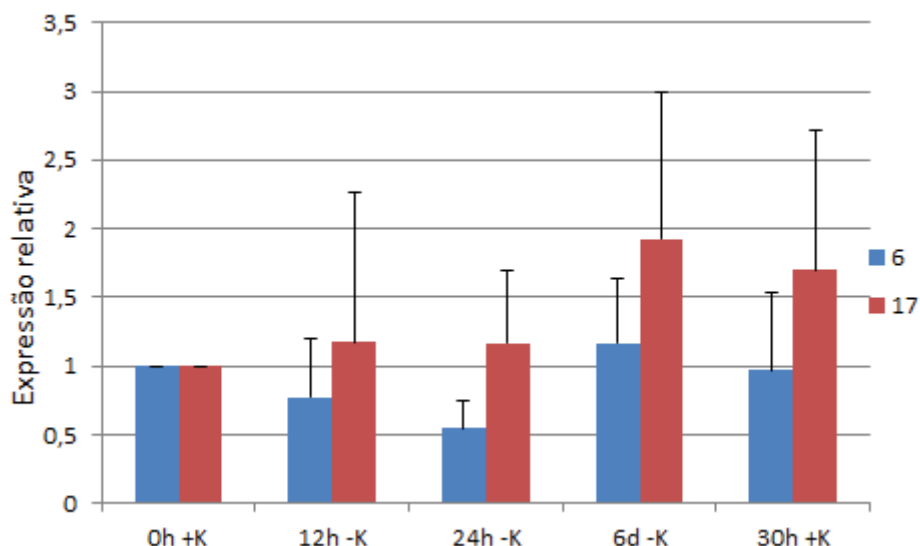


Figura 11- Análise da expressão relativa do gene *NrHAK1* em raízes das linhagens transgênicas 6 (azul) e 17 (vermelho). As barras correspondem à média e respectivos desvios para três repetições independentes. (+ K – presença de K^+ ; -K – ausência de K^+)

4.1.5. Expressão Transiente

4.1.5.1. Construção do cassete de expressão para ensaio de expressão transiente

A construção para o ensaio de expressão transiente em eucalipto foi iniciada a partir da digestão do cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz, previamente inserido no vetor pCAMBIA 1381-z, com as enzimas *NcoI* e *BamHI*. O vetor escolhido para receber este cassete foi o pPR97, pois este possui a canamicina como agente de seleção em plantas. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 1% e purificado do gel com o *Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Em seguida realizou-se a ligação do fragmento purificado no vetor pPR97 igualmente

digerido. A transformação de *E. coli* resultou em diferentes colônias positivas, das quais cinco foram confirmadas por PCR realizado utilizando os oligonucleotídeos promotor e gene-específicos (EGRT-conF e GUS-R) (Figura 12). Como controle negativo foi utilizado o vetor pCAMBIA 1381-z sem inserto.

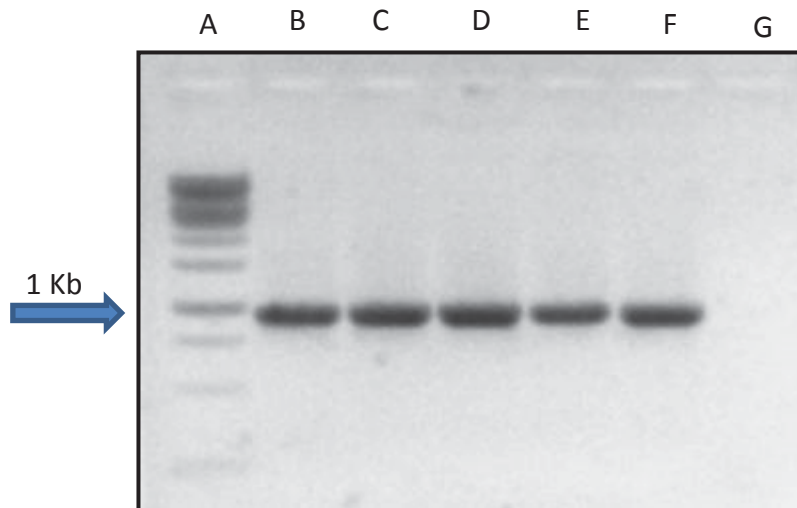


Figura 12 - PCR confirmatório da transformação de *E. coli* com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz inserido em pPR97. **A**- Ladder 1 kb; **B a F** – colônias positivas; **G**- controle negativo de amplificação. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. A seta indica a posição do produto esperado.

Alguns clones recombinantes foram então submetidos à reação de sequenciamento para a verificação da correta inserção do cassete de expressão no vetor pPR97, a qual foi devidamente confirmada.

4.1.5.2. Transformação de Agrobactéria

Uma vez obtido o vetor pPR97 recombinante apresentando o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz foi realizada a transformação do mesmo em *Agrobacterium tumefaciens*. Após a transformação, a confirmação da inserção foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5BBamHI e GUS-R. Para tal, 5 colônias foram selecionadas para a extração de DNA plasmidial por mini preparação por lise alcalina. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, sendo confirmada a transformação (Figura 13).

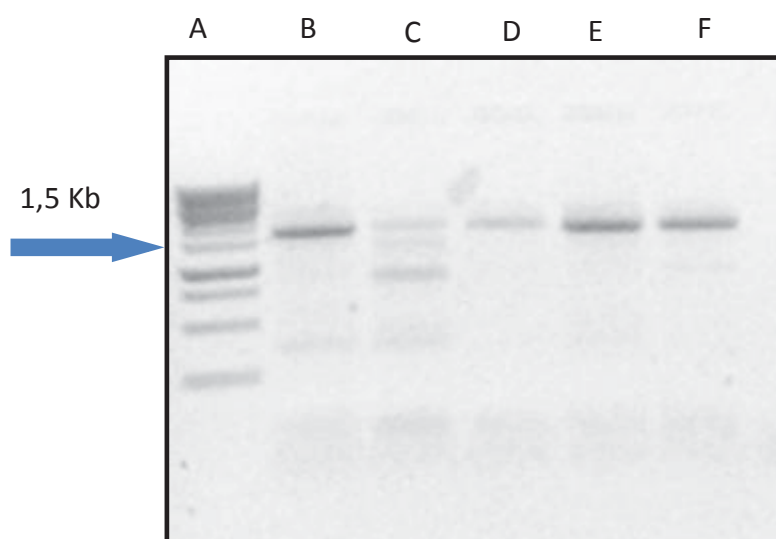


Figura 13 - Amplificação do cassete de expressão para confirmação da inserção do vetor pPR97 recombinante em *Agrobacterium tumefaciens*. **A**- Ladder 1 kb; **B a F**- clones. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder.

4.1.5.3. Expressão transiente em eucalipto empregando pPR97

Os ensaios de expressão transiente estão sendo realizados em parceria com a empresa Suzano Papel e Celulose e se encontram em andamento.

4.2. Análises do Promotor de Folha

4.2.1. Validação biológica do candidato com expressão específica de folha

O EST candidato (EGJFLV3247C08.g) selecionado por análises *in silico* no banco de dados FORESTs (Bravo, resultados não publicados) foi 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 14). O padrão observado contrasta com o padrão ubíquo de expressão obtido para um gene de eucalipto (*GAPDH*) considerado constitutivo (Figura 15). A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados obtidos na análise *in silico* e na validação via RT-PCR quanto a tecido-especificidade do candidato selecionado.

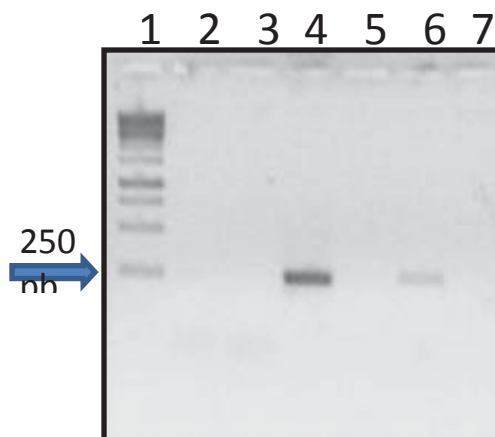


Figura 14 - Validação da expressão tecido-específica do candidato selecionado empregando RT-PCR. **1-** Ladder 1 kb; As amplificações foram realizadas utilizando amostras de cDNA provenientes de **2-** caule; **3-** raiz; **4-** folha; **5-** fruto; **6-** pool de tecidos; **7-** controle negativo. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição do produto esperado.

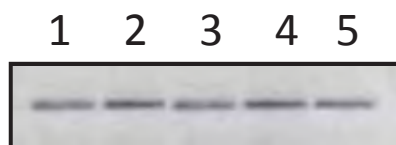


Figura 15 - Amplificação do gene normalizador *GAPDH* em diferentes órgãos/tecidos de eucalipto. As amplificações foram realizadas utilizando amostras de cDNA provenientes de **1-** caule; **2-** raiz; **3-** folha; **4-** fruto; **5-** pool de tecidos. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo.

Tabela 1- Resultados da análise de similaridade (usando Blast), predição da expressão *in silico* e validação da expressão por RT-PCR do EST selecionado no banco FORESTs.

EST	EGJFLV3247C08.g
Blast	Tirosina decarboxilase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
TAIR	AT2G20340.1
<i>In silico</i>	Folha
RT-PCR	Folha

4.2.2. Extração de DNA genômico de eucalipto

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de folha de eucalipto. A extração teve um rendimento de 216,23 ng/ul. As bibliotecas genômicas foram produzidas a partir de da digestão deste DNA com as enzimas de restrição *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *SspI*, e então utilizadas para a realização da PCR primária e secundária do *Genome Walking*.

4.2.3. Isolamento da região promotora

Após a construção das bibliotecas genômicas, utilizou-se a técnica de *Genome Walking* (GW) para o isolamento da região promotora do EST candidato EGJFLV3247C08.g previamente validado. Para isso foram utilizados dois oligonucleotídeos gene-específicos desenhados com base na sequência de nucleotídeos

do EST. Em paralelo, reações utilizando somente os oligos complementares aos adaptadores foram realizadas como controle negativo. Os produtos gerados nesta reação controle foram comparados aos produtos amplificados com os oligos gene-específicos, e nesse caso, os de mesmo tamanho foram considerados falsos positivos.

Nesse caso, um produto de 1500 pares de bases (pb) foi amplificado na reação correspondente a biblioteca *EcoRV* (Figura 16). Nos controles negativos nenhuma amplificação foi observada.

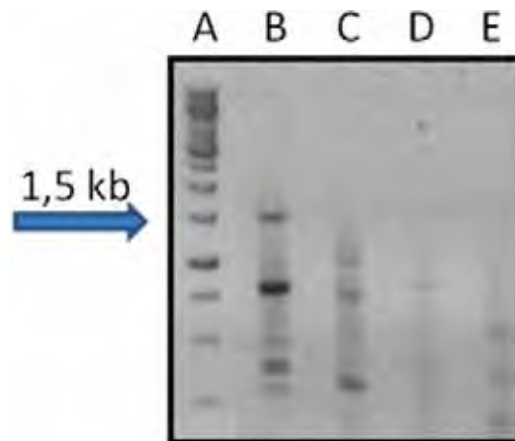


Figura 16 - Produtos de amplificação oriundos do PCR secundário do *Genome Walking* para o candidato específico de folha. **A**- GeneRuler 1 kb DNA Ladder; **B a E**- Produtos amplificados nas bibliotecas *EcoRV*, *DraI*, *PvuII*, *SspI*, respectivamente. A seta indica a banda de 1500 pb do marcador. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2.4. Clonagem e sequenciamento da região amplificada no GW

O fragmento de 1500 pb visualizado na Figura 16 foi purificado do gel de agarose e clonado no vetor pGEM-Teasy. Os clones recombinantes foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, a qual permite a liberação do fragmento clonado no vetor, e a presença do fragmento de 1500 pb pode ser assim confirmada (Figura 17).



Figura 17 - Análise da digestão com a enzima *EcoRI* de um dos clones recombinantes obtidos no vetor pGEM-Teasy (3 kb). **A**- Ladder 1 kb. **B**- Clone recombinante contendo o fragmento promotor do candidato com expressão específica em folha (1,5 kb). As setas indicam as bandas de 1500 e 3000 pb. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2.5. Correlação da região amplificada com o EST

O fragmento amplificado no GW e clonado no vetor pGEM foi sequenciado, e a sequência de nucleotídeos obtida analisada em diferentes bancos de dados. Quando submetida no banco do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nenhuma similaridade com outras sequências depositadas pode ser observada, confirmando desta maneira, que o fragmento amplificado corresponde a uma porção não identificada do genoma do eucalipto. Em paralelo, a sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado no GW foi alinhada com a sequência do EST validado visando detectar a presença de uma região de sobreposição entre elas, confirmando assim que a porção amplificada está localizada acima da região codificadora do EST. Entretanto, o alinhamento de tais sequências não evidenciou tal sobreposição, indicando que outra região do genoma não relacionada com o EST validado foi isolada.

Durante a realização dos referidos ensaios, o banco de dados do genoma do eucalipto (*Phytozome*; <http://www.phytozome.net>), que disponibiliza a sequência do genoma de várias espécies, inclusive de *Eucalyptus grandis*, se tornou público. Em função dos problemas encontrados no GW, decidiu-se desenhar oligonucleotídeos gene-específicos para amplificação do promotor com base nas sequências da região genômica correspondente disponibilizadas no *Phytozome*. Nesse caso, os oligos desenhados foram dotados dos sítios para as enzimas de restrição *NcoI* e *BamHI* para posterior inserção em pCAMBIA 1381z (Cambia).

4.2.6. Construção do cassete de expressão

A construção de um cassete de expressão contendo o promotor do gene com padrão de expressão específico de folha fusionado ao gene GUS foi empreendida visando as análises funcionais. Para tal, oligonucleotídeos gene-específicos (*CLNcoI* e *CLBamHI*) foram desenhados com o objetivo de amplificar a região promotora a partir de DNA genômico de eucalipto. O produto amplificado por PCR pode ser visualizado na Figura 18.

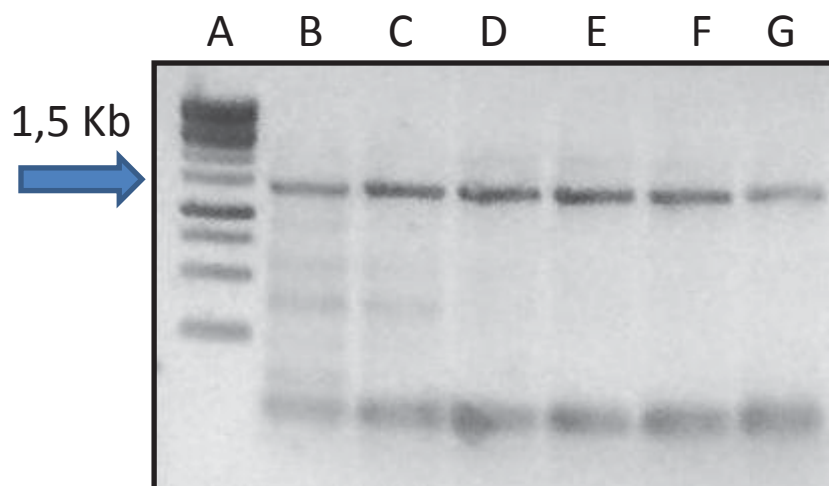


Figura 18 - Amplificação da região promotora do candidato com expressão em folha a partir de DNA genômico de eucalipto. **A**- GeneRuler 1 kb DNA Ladder; **B a G** - produtos gerados na amplificação usando os oligos *CLBamHI* e *CLNcoI* (1,5 Kb). Os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A seta indica a posição da banda de 1500 pb do marcador.

O fragmento amplificado na Figura 18 foi purificado do gel empregando o *Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen). Em seguida realizou-se a ligação do fragmento purificado no vetor pCAMBIA 1381-z igualmente digerido. A transformação de *E. coli* resultou em diferentes clones, dos quais quatro foram confirmados como positivos por PCR de colônia usando os oligonucleotídeos empregados na clonagem (Figura 19). Como controle negativo foi utilizado o vetor pCAMBIA 1381-z sem inserto.



Figura 19 - PCR confirmatório da transformação de *E. coli* com o cassete de expressão contendo o promotor específico de folha inserido em pCAMBIA 1381-z. **A**- Ladder 1 kb; **B a V** – diferentes colônias analisadas; **X**- controle negativo de amplificação. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. A seta indica a posição do produto esperado.

4.2.7. Sequenciamento do cassete de expressão contendo o promotor de folha

O seqüenciamento do cassete de expressão contendo o promotor de folha foi realizado visando confirmar a correlação do fragmento promotor clonado em pCAMBIA 1381-z com a sequência depositada no banco de dados *Phytozome* que foi utilizada para desenho dos oligonucleotídeos de clonagem. Com base na análise realizada foi possível confirmar que a sequência do promotor clonado possui correlação com a sequência depositada no banco de dados.

5. Discussão

5.1. Caracterização funcional do promotor de raiz

Os cassetes de expressão geralmente utilizados para a produção de plantas geneticamente modificadas (PGMs) são baseados em promotores com expressão constitutiva que conferem um gasto energético elevado para a planta e direcionam a expressão do gene alvo em órgãos/tecidos não desejados. A utilização de promotores tecido-específicos, por outro lado, é capaz de direcionar a expressão do transgene apenas nos órgãos/tecidos de interesse, evitando assim uma expressão desnecessária e aumentando a valorização e aceitação dos produtos derivados das PGMs.

Com o intuito de caracterizar funcionalmente o promotor de um gene de eucalipto com expressão específica em raiz, este foi clonado e fusionado ao gene GUS (que codifica a β -glucuronidase) e inserido em plantas de tabaco. A clonagem deste promotor foi baseada na identificação de um gene que codifica um transportador de potássio com expressão exclusiva no sistema radicular de eucalipto (Ribeiro, 2009). Em geral, esses transportadores atuam como um sistema de alta afinidade de absorção de potássio em plantas (Nieves-Cordones *et al.*, 2010).

No presente estudo, plântulas de três linhagens transgênicas foram submetidas a ensaio histoquímico e, nesse caso, uma expressão de GUS nos tecidos vasculares de raiz e folha pode ser evidenciada. Esses resultados comprovam que o fragmento promotor amplificado no GW é funcional e dotado de atividade transcricional. Para confirmar a expressão em tecido vascular, cortes histológicos foram preparados a partir das raízes e

folhas submetidas ao ensaio histoquímico, e como esperado, a presença de coloração azulada foi detectada especificamente nos feixes vasculares.

A expressão vascular de genes que codificam transportadores de potássio em outras espécies já foi documentada usando sistemas heterólogos (Lan *et al.*; 2010, Lagarde *et al.*; 1996, Ren *et al.*; 2005, Martín *et al.*; 2000). Por outro lado, a não validação da esperada expressão raiz-específica em planta modelo pode estar relacionada, dentre outros fatores, ao tamanho do promotor clonado (~1350 pb) bem como à ausência no tabaco dos elementos regulatórios que seriam necessários para regular e direcionar a expressão tecido-específica como seria esperado em eucalipto, tais como os *enhancers* e outros elementos distais.

A base genética que determina o perfil de expressão de cada gene reside, em parte, no seu promotor e, em parte, nos fatores de transcrição específicos que se associam ao promotor e a outras sequências *cis*-regulatórias presentes no genoma (Wray *et al.*, 2003). A regulação espaço-temporal da expressão de um dado gene requer, portanto, a ligação dos fatores de transcrição em sequências que estão localizadas na região proximal ou a certa distância do promotor *core* (Weinzierl, 1999; Carey & Smale, 2000; Lemon & Tjian, 2000). A ausência de tais sequências regulatórias e *enhancers*, por exemplo, pode determinar um padrão de expressão não esperado ou inespecífico. Os *enhancers* são elementos que atuam na regulação da expressão de um grande número de genes eucariotos. Independente da sua orientação e posição em relação ao sítio de início da transcrição, um *enhancer* pode exercer suas funções em locais próximos ou a longas distâncias do gene a ser regulado (Singer *et al.*, 2011). Podem estar localizados a mais de 10 kb de distância do gene alvo ativando-o ao longo do cromossomo (West *et al.*, 2005) e aumentando a probabilidade deste ser ativado em

um determinado tipo celular (Walters *et al.*, 1995). Estes elementos possuem sítios de ligação para fatores de transcrição constitutivos ou tecido/célula-específicos que ativam a transcrição aumentando a probabilidade e/ou a taxa de início da transcrição de um dado promotor, desenovelando a cromatina e auxiliando o acesso da maquinaria de transcrição (Raab *et al.*, 2010). Portanto, um gene deve possuir vários elementos *enhancer*, sendo que cada um contribui, de maneira cumulativa, para a regulação espacial e temporal geral da expressão gênica (Blackwood *et al.*, 1998). Outro exemplo de elementos distais importantes refere-se aos insuladores. Acredita-se que as sequências insuladoras (0,5 a 3 kb) atuam como elementos de DNA transcricionalmente neutros que bloqueiam, ou isolam, a influência positiva de elementos *enhancers*, ou negativa de silenciadores, ou ainda os efeitos de repressão da heterocromatina (Blackwood *et al.*, 1998).

A busca por possíveis elementos *cis*-regulatórios no promotor clonado detectou a presença de elementos comumente encontrados em promotores tais como o CAAT Box e o TATA Box. O TATA Box plausível está localizado a 69 nucleotídeos do códon de início da tradução (+1). A presença de elementos *cis*-regulatórios envolvidos em resposta à regulação hormonal e compostos secundários tais como etileno, metil jasmonato, e ácido abscísico é bastante relevante. Uma correlação entre o transporte de auxina e a atividade de transportadores de potássio, por exemplo, já foi demonstrada (Vicente-Agullo *et al.*, 2004). Nesse estudo constatou-se que a privação de K causou uma mudança na distribuição de auxina e no comportamento gravitropico de raízes de *Arabidopsis*. Neste estudo, mutações no gene *TRH1*, que codifica um transportador de potássio, foram prejudiciais ao desenvolvimento das raízes. Adicionalmente, a taxa de

translocação de auxina da parte aérea para raízes e o fluxo de $[H^3]$ IAA em raízes isoladas foi reduzido em mutantes *trh1*.

A fim de investigar se o promotor clonado responde à disponibilidade de potássio do meio, plântulas de três linhagens transgênicas investigadas nesse estudo foram submetidas a estresse de potássio em solução hidropônica. A escolha desse estresse foi baseada em dados da literatura indicando que o gene ortólogo de *Arabidopsis thaliana* (*AtHAK5*) é altamente transcrito em condições de privação de potássio em raízes (Ahn *et al.*, 2004). Neste estudo, o gene *AtHAK5* demonstrou ser altamente responsivo a privação de potássio, sendo sua expressão altamente induzida aos 6 dias após a remoção do elemento. Em contrapartida, uma diminuição na expressão relativa deste gene foi observada após 30 h de reexposição das plântulas estressadas ao potássio. Com base nesses resultados, optamos por monitorar a expressão relativa do gene GUS sob controle do promotor em estudo em tempos iniciais (12 e 24 h após início do estresse), avaliando assim se a resposta do promotor à baixa concentração de potássio é rápida, e após 6 dias como descrito por Ahn e colaboradores (2004), para verificar se a resposta é tardia. No caso da reposição, adotou-se o tempo de 30 h como descrito (Ahn *et al.*, 2004). Os resultados obtidos nessas avaliações parecem indicar que o promotor investigado é responsivo à baixa concentração de potássio, sendo induzido na ausência deste elemento. As diferenças constatadas no padrão de indução do promotor nas duas linhagens testadas (6 e 17) podem estar relacionadas com o local de inserção do cassete contendo o referido promotor no genoma do tabaco, ou ainda, a efetividade do tratamento realizado. Por outro lado, a diferença observada na expressão temporal de GUS em folhas e raízes das duas linhagens transgênicas analisadas pode ser atribuída à diferença na concentração de K^+ presente nos referidos órgãos no início do

estresse. Em estudo realizado por Gierth e colaboradores (2005) constatou-se que no início do estresse a concentração de potássio nas raízes é maior do que na parte aérea, e que tais concentrações se tornam baixas e similares somente após 96 h da remoção do elemento (redução de 60%). Com base nesses dados, no início do estresse, a deficiência de potássio deve se manifestar de forma mais rápida e efetiva na parte aérea, o que justificaria uma indução mais rápida do promotor nas folhas (12 h após) se comparado às raízes (6 dias). Embora no presente estudo a concentração de K^+ nas plântulas tratadas não tenha sido determinada, a efetividade do estresse foi confirmada com base na indução da expressão de um gene sabidamente responsivo a deficiência deste elemento. Entretanto, devido à variação observada entre as linhagens analisadas, e até mesmo entre as triplicatas biológicas, o que gerou um elevado desvio padrão, novos ensaios confirmatórios precisam ser empreendidos.

Cabe ressaltar a expressão induzida de genes que codificam transportadores de potássio em resposta à privação deste elemento não é uma regra. Gierth e colaboradores (2005), por exemplo, verificaram que dos cinco transportadores de potássio analisados por meio de microarranjo, somente um (*AtHAK5*) mostrou-se induzido pela privação de potássio. Da mesma maneira, estudos realizados em *Arabidopsis* demonstraram que o gene *AKT1*, pertencente à família de transportadores de potássio, e que possui expressão preferencial em raízes, não é responsivo à baixas concentrações de potássio (Lagarde *et al.*, 1996). Recentemente, entretanto, um gene pertencente ao Grupo I da família HAK identificado em tomate, e denominado *LeHAK*, demonstrou ser mais expresso em raízes de plantas submetidas a privação de potássio (Nieves-Cordones *et al.*, 2007).

Do ponto de vista aplicado, o presente promotor tem uma grande utilidade. Por se tratar de um promotor aparentemente responsivo a baixas concentrações de potássio,

ele poderá ser usado como uma eficiente ferramenta para manter a homeostase deste elemento. Apenas dois genes codificando proteínas envolvidas no transporte de potássio, denominados *EcKT1* e *EcKT2*, foram identificados até então na espécie *Eucalyptus calmadulensis*. Estes genes pertencem à família TRK/HKT, e a inserção destes em oócitos de *Xenopus laevis* resultou em um aumento dos níveis de potássio na presença de sódio, e também transporte K^+ na ausência deste elemento (Liu *et al.*, 2001). Adicionalmente, o referido promotor pode ser usado para direcionar a expressão genes de interesse em tecidos vasculares, tais como genes de resistência a patógenos associados ao tecido vascular.

5.2. Promotor de folha

O EST candidato selecionado e validado por predições *in silico* teve seu padrão de expressão específica em folha de eucalipto confirmado em ensaios de RT-PCR. Este EST codifica uma tirosina descarboxilase (TyrDC), descrita como desempenhando um papel importante na síntese de diferentes metabólitos secundários em plantas, muitos deles relacionados com tolerância a estresses.

Em trabalho realizado por Marques *et al.* (1988) constatou-se um aumento na taxa de transcritos bem como da atividade transiente da TyrDC, em resposta ao tratamento de uma cultura de suspensão de células com um elicitor fúngico. O estudo realizado por György *et al.* (2009), por outro lado, indica que a TyrDC está envolvida na biossíntese de um componente farmacológico importante da raiz-dourada (*Rhodiola rosea*). Uma análise por PCR em tempo real evidenciou que este gene é expresso tanto

em folhas como em raízes, sendo tal expressão maior em raízes do que em folhas. Facchini e colaboradores (1994) realizaram estudos visando analisar a especificidade dos transcritos *TYDC1-like* e *TYDC2-like*, pertencentes à família TyrDC de ópio (*Opium poppy*), e verificaram que o nível de transcritos é maior em raízes do que em outros órgãos.

Apesar dos dados relatados acima evidenciarem uma expressão raiz-específica da TyrDC, em eucalipto, a validação da expressão em folha representa um dado importante. Como os principais promotores caracterizados nesta espécie são específicos de tecido vascular, tal promotor poderá ser empregado para direcionar a expressão de genes de interesse, como aqueles com ação contra patógenos e insetos, exclusivamente em folhas.

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

O fragmento amplificado por *Genome Walking* e correspondente à região promotora do gene com expressão em raiz possui atividade transcricional, sendo, portanto, funcionalmente ativo.

O promotor específico de raiz direciona a expressão do gene repórter GUS em feixes vasculares de folhas e raízes, e mostrou ser responsivo a baixas concentrações de potássio.

O EST candidato com expressão em folha teve seu perfil de expressão validado e seu promotor foi clonado visando a sua posterior análise funcional.

7. Perspectivas

A fim de dar seguimento à caracterização do promotor do gene que codifica um transportador de potássio em eucalipto, ensaios de expressão transiente estão sendo realizados em parceria com a empresa Suzano Papel e Celulose. Pretende-se com tais ensaios validar a tecido-especificidade do promotor em eucalipto, já que em planta modelo o padrão de expressão por ele determinado, embora restrito ao sistema vascular, foi generalizado. Para o candidato com padrão específico em folha será empreendida a transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, seguida da transformação em discos foliares de tabaco para posterior validação funcional.

8. Referências

AHN, S.J.; SHIN, R.; SCHACHTMAN, D.P. Expression of *KT/KUP* Genes in Arabidopsis and the Role of Root Hairs in K₊ Uptake. **Plant Physiology**, v.134, p.1135–1145, 2004.

ANDRADE, E.N. O Eucalipto. 2ª edição Impresso nas Oficinas tipográficas da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 667p. São Paulo, 1961.

ARAGÃO, F.J.L.; SANTOS, M.O.; MORAIS, L.S.; ROMANO, E. **Metodologias para transformação genética de Plantas Modelo**. Circular Técnica 15, ISSN 1516-4349, Embrapa, Brasília, DF, 2002.

ASHLEY, M.K.; GRANT, M.; GRABOV, A. Plant responses to potassium deficiencies and signaling in plants: a role for potassium transport proteins. **J. Exp. Bot.**, v.57, p. 425-436, 2006.

BANUELOS, M.A.; KLEIN, R.D.; ALEXANDER-BOWMAN, S.J.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. A potassium transporter of the yeast *Schwanniomyces occidentalis* homologous to the Kup system of *Escherichia coli* has a high concentrative capacity. **EMBO J.**, v.14, p.3021–3027, 1995.

BLACKWOOD, E.M.; KADONAGA, J.T. Going the distance: a current view of enhancer action. **Science**, v.281, p.60-63, 1998.

BRACELPA – Associação Brasileira de Silvicultura. Dados do Setor, 2011. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>.

Acesso em: 02 mar. 2011.

BURKE, T.W.; KADONAGA, J.T. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. **Genes Dev.**, v.10, p.711–724, 1996.

BUTLER, J.E.F.; KADONAGA, J.T. Enhancer–promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. **Genes Dev.**, v.15, p.2515-2519, 2001.

CAI, M.; WEI, J.; XIANGHUA, L.; CAIGUO, X.; SHIPING, W. A rice promoter containing both novel positive and negative cis-elements for regulation of green tissue specific gene expression in transgenic plants. **Plant Biotechnol. J.** v.5, p.664-674, 2007.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Rep.**, v.11, p.113-116, 1993.

DEVIC, M.; ALBERT, S.; DELSENY, M.; ROSCOE, T. J. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.35, p.1-9, 1997.

EPSTAIN, E.; RAINS, D.W.; ELZAM, O.E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.49, p.684-692, 1963.

FERNANDO, M.; KULPA, J.; SIDDIGI, M.Y.; GLASS, A.D. Potassium-dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots. **Plant Physiol.**, v.92(4), p.1128-1132, 1990.

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

GAGO, J.; GRIMA-PETTENATI, J.; GALLEGGO, P.P. Vascular-specific expression. of GUS and GFP reporter genes in transgenic grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Albariño)

conferred by the *EgCCR* promoter of *Eucalyptus gunni*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.413-419, 2011.

GIERTH, M.; PASCAL, M.; SCHROEDER, J.I. The potassium transporter AtHAK5 functions in K⁺ deprivation-induced high-affinity K⁺ uptake and AKT1 K⁺ channel contribution to K⁺ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots. **Plant Physiol.**, v.137, p. 1105–1114, 2005.

GLASS A. The regulation of potassium absorption in barley roots. **Plant Physiol.**, v.56, p.377–380, 1975.

GOODRICH, J.A.; TJIAN, R. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. **Nature Reviews**, v.11, p.549-558, 2010.

GRABOV., A. Plant KT/KUP/HAK Potassium Transporter: Single Family – Multiple Functions. **Ann. Bot.**, p.1-7, 2007.

GUO, Z.; YANG, Q.; WAN, X.Q.; YAN, P.Q. Functional characterization of a potassium transporter gene NrHAK1 in *Nicotiniana rustica*. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v.9(12): p.944-952. 2008.

GYÖRGY, Z.; JAAKOLA, L.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Isolation and genotype-dependent, organ-specific expression analysis of a *Rhodiola rosea* cDNA encoding tyrosine decarboxylase. **J Plant Physiol.**, v.14, p.1581-1586, 2009.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **Embo J.**, v.6(13), p.3901-3907, 1987.

JUVEN-GERSHON, T.; KADONAGA, J.T. Regulation of Gene Expression via the Core Promoter and the Basal Transcriptional Machinery. **Dev Biol.**, v.15; 339(2): 225–2, 2010.

KAWALLECK, P.; KELLER, H.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D.; SOMSSICH, I. A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. **The Journal of Biological Chemistry**. v.266, p.2189-2194, 1993.

KIM, E.J.; KWAK, J.M.; UOZUMI, N.; SCHROEDER, J.I. AtKUP1: An Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity. **The Plant Cell**, v.10, p.51-62, 1998.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAM, N. Improved detection of Sugarcane yellow leaf virus using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **J. Virol. Meth.**, v.103, p.109-20, 2002.

KUNKEL, T.; NIU, Q.W.; CHAN, Y.S.; CHUA, N.H. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation. **Nat. Biotechnol.**, v.17, p.916-919, 1999.

KUTACH, A.K.; KADONAGA, J.T. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. **Mol. Cell Biol.**, v.20, p.4754–4764, 2000.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Capítulo 6: **Transferência de vetores para *Agrobacterium***. Em: BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.C. Manual de Transformação Genética de Plantas. Embrapa– Brasília, DF, 1998.

LAGARDE, D.; BASSET, M.; LEPETIT, M.; CONEJERO, G.; GAYMARD, F.; ASTRUC, S.; GRIGNON, C. Tissue-specific expression of Arabidopsis AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. **Plant J.**, v.9, p.195–203, 1996.

LAGRANGE, T.; KAPANIDIS, A.N.; TANG, H.; REINBERG, D.; EBRIGHT, R. New core promoter element in RNAPolymerase II dependent transcription: Sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. **Genes Dev.**, v.12, p.34–44, 1998.

LAN, W.; WANG, W.; WANG, S.; LI, L.; BUCHANAN, B. B.; LIN, H.; GAO, J.; LUAN, S. A rice high-affinity potassium transporter (HKT) conceals a calcium-permeable cation channel. **Plant Biology**. PNAS Early Edition, p.1-6, 2010.

LAUVERGEAT, V.; RECH, P.; JAUNEAU, A.; GUEZ, C.; COUTOS-THEVENOT, P.; GRIMA-PETTENATI, J. The vascular expression pattern directed by the Eucalyptus gunnii cinnamyl alcohol dehydrogenase EgCAD2 promoter is conserved among woody and herbaceous plant species. **Plant Mol. Biol.**, V.50, P.497-509, 2002.

LIU, W.; FAIRBAIRN, D.J.; REID, R.J.; SCHACHTMAN, D.P. Characterization of two HKT1 homologues from Eucalyptus camaldulensis that display intrinsic osmosensing capability. **Plant Physiology**, v.127, p.283-294, 2001.

LIVAK, K.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCt Method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

MAATHUIS, F.J.M.; SANDERS, D. Mechanisms of high-affinity potassium uptake in roots of Arabidopsis thaliana. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.91, p.9272–9276, 1994.

MARQUES, I.A.; BRODELIUS, P.E. Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. 1. Induction and purification. **Plant Physiol.**, v.88, p.46–51, 1988.

MARTIN, A. C.; POZO, J.C.; IGLESIAS, J.; RUBIO, V.; SOLANO, R.; PEÑA, A.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* . v.24(5), p.559-567, 2000.

- MARTINEZ-CORDERO, M.A.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. High-affinity K⁺ in pepper plants. **J. Exp. Bot.**, v. 56, pp.1553–1562. 2005.
- MORA, A.L.; GARCIA, C.H. A cultura do eucalipto no Brasil. 1. Ed. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Silvicultura**, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- NIEVES-CORDONES, M.; ALEMÁN, F.; MARTÍNEZ, V.; RUBIO, F. The Arabidopsis thaliana HAK5 K⁺ transporter is required for plant growth and K⁺ acquisition from low K⁺ solutions under saline conditions. *Molecular Plant*, v.3, p.326–333, 2010.
- PAINE, T. D.; STEINBAUER, M.J.; LAWSON, S.A. Native and Exotic Pests of *Eucalyptus*: A Worldwide Perspective. **Annu. Rev. Entomol.**, v.56, p.181–201, 2010.
- PRYOR, L. Eucalyptus. In: **A. Halevy CRC Handbook of Flowering**. 1.ed. Boca Raton: Franklin Book Company, Incorporated. 1985. v.2:p. 476-482.
- PYO, Y. J.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J. I.; CHO, M. H. High-affinity K⁺ transporter in Arabidopsis: AtHAK5 and AKT1 are vital for seedling establishment and postgermination growth under low-potassium conditions. **Plant Physiology**, v.153, p.863-875, 2010.
- QI, Z.; HAMPTON, C.R.; SHIN, R.; BARKLA, B.J.; WHITE, P.J.; SCHACHTMAN, D.P. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in Arabidopsis. **J.Exp. Bot.** v.59, p.595–607, 2008.

RAAB, J.R.; KAMAKAKA, R.T. Insulators and promoters: closer than we think. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p439-446, 2010.

REN, Z.; GAO, J.; LI, L.; CAI, X.; HUANG, W.; CHAO, D.; ZHUN, M.; WANG, Z.; LUAN, S.; LIN, H. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. **Nature Genetics**. v.37, N°10, p.1141-1146, 2005.

RIBEIRO, C.L. **Caracterização molecular de um promotor raiz-específico de eucalipto**. Trabalho de conclusão (Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2009.

RIGAS, S.; DEBROSSES, G.; HARALAMPIDIS, K.; VICENTE-AGULLO-Agullo, F.; FELDMANN; K. A.; GRABOV, A.; DOLAN, L; HATZOPOULOS, P. TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in Arabidopsis root hairs. **Plant Cell**, v.13, p.139–151, 2001

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Em: Krawetz S., Miserner S. (eds). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, p.365-86, 2000.

RUBIO, F.; NIEVES-CORDONES, M.; ALEMÁN, F.; MARTINEZ, V. Relative contribution of AtHAK5 and AtAKT1 to K⁺ uptake in the high-affinity range of concentrations. **Physiol. Plant.**, v.134, p.598–608, 2008.

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

SASSAKI, F. T. **Isolamento e Caracterização de Promotores Órgão-específicos a partir de informações do Banco FORESTs (Eucalyptus Genome Sequencing**

Project Consortium). Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2008.

SBS. Fatos e números do Brasil florestal. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo. 109p. 2008

SCARPINELLA, G.A. **Reflorestamento no Brasil e o Protocolo de Quioto.** São Paulo, 2002, Dissertação (exigência para obtenção do título de mestre em energia) – Instituto de Eletrotécnica e Energia –IEE, Universidade de São Paulo.

SCHLEYER, M.; BAKKER, E.P. Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that the K⁺-uptake protein Kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C-terminus. **J. Bacteriol.**, v.175, p.6925–6931, 1993.

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.

SINGH, B.K. Transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. **Plant Physiol.**, v.118, p.1111-1120, 1998.

SZABADOS, L.; CHARRIER, B.; KONDOROSI, A.; BRUIJN, F. J.; RATET, P. New plant promoter and enhancer testing vectors. **Molecular Breeding**, v.1, p.419-423, 1995.

THOMAS, M.C.; CHIANG, C.M. The general transcription machinery and general cofactors. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.41, p.105–178, 2006.

VENTER, M.; BOTHA, C. F. Promoter analysis and transcription profiling: Integration of genetic data enhances understanding of gene expression. **Physiologia Plantarum**, v.120, p.74-83, 2004.

VERY, A.A.; SENTENAC, H. Molecular mechanisms and regulation of K₊ transport in higher plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.575–603, 2003.

VICENTE-AGULLO, F.; RIGAS, S.; DESBROSSES, G.; DOLAN, L.; HATZOPOULOS, P.; GRABOV, A. Potassium Carrier TRH1 is required for auxin transport in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, v.40, p.523-535, 2004.

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

VIJAYBHASKAR, V.; SUBBIAH, V.; KAUR, J.; VIJAYAKUMAR, P.; SIDDIG, I. Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. **J. Biosci.**, v.33 p.185–193, 2008.

WALTERS, M.C.; FIERING, S.; EIDEMILLER, J.; MAGIS, W.; GROUDINE, M.; MARTIN, D.I.K. Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. **Proc Natl Acad Sci.** v.92, p.7125–7129, 1995.

WEST, A.G.; FRASER, P. Remote control of gene transcription. **Humand Molecular Genetics.** v.14, p.101-111, 2005.