

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DOIS PROMOTORES DE EUCALIPTO: COM PADRÃO DE EXPRESSÃO UBÍQUO E ESPECÍFICO DE CÂMBIO

LARISSA CAROLINE FIALHO

BOTUCATU-SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DOIS
PROMOTORES DE EUCALIPTO: COM PADRÃO DE
EXPRESSÃO UBÍQUO E ESPECÍFICO DE CÂMBIO

LARISA CAROLINE FIALHO

IVAN DE GODOY MAIA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós- Graduação em Ciências
Biológicas Genética

BOTUCATU – SP

2013



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



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Fialho, Larissa Caroline.

Identificação e caracterização da região promotora de dois genes de eucalipto: com padrão de expressão ubíquo e específico de câmbio/ Larissa Caroline Fialho. - Botucatu, 2013

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

Orientador: Ivan de Godoy Maia

Capes: 20202008

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Genética – Expressão. 3. Actina. 4. Eucalipto.
5. Células e tecidos vegetais.

Palavras-chave: Actina; Eucalipto; Expressão gênica, Lacase, Promotor tecido-específico.

Agradecimentos

À **Deus**, por caminhar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia**, pela oportunidade, pela competência, ensinamentos valiosos e orientação excepcional.

À **Dra. Juliana Pereira Bravo** por me instruir dentro do laboratório.

À Prof. **Dra. Tatiane Maria Rodrigues** e à aluna do Laboratório de Anatomia Vegetal do departamento de Botânica da UNESP de Botucatu **Ana Monetta** pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas e digitalização das imagens.

Aos meus companheiros de laboratório **Márcio, Eder, Cris, Gicela, Bruno, Laura e Alessandra**, pelas conversas, pelos conselhos e risadas, que foram de grande valia.

À minha amiga e companheira de laboratório **Alessandra Vasconcellos Nunes** por estar sempre ao meu lado, me auxiliando, me incentivando, e sendo amiga em todos os momentos.

A **todos os servidores** do Departamento de Genética, pela amizade e pelo auxílio nos momentos que precisei.

À **Universidade Estadual Paulista**, pela estrutura e oportunidade.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À minha amiga **Ana Cláudia Simões**, por ter compartilhado toda minha vida acadêmica, sempre me estendendo as mãos.

Aos meus pais **Atailde e Andrea** e minha irmã **Lariane**, que sempre foram meu apoio, tanto financeiro como psicológico nesta etapa, sendo sempre muito compreensivos e amorosos.

Ao meu noivo e futuro esposo, **Leandro** pelo companheirismo, por sempre me incentivar, estar ao meu lado, e me apoiar com muita compreensão e carinho.

*“Quanto maiores somos em humildade,
tanto mais próximos estamos da grandeza”*

Rabindranath Tagore

RESUMO:

A franca expansão das florestas de eucalipto observada nos últimos anos em diferentes estados brasileiros aumentou a dependência tecnológica da cultura, tornando necessária a sua inserção no contexto biotecnológico. Para tal, a disponibilidade de ferramentas moleculares que viabilizem a produção de árvores geneticamente modificadas se faz necessária. Nesse contexto, o presente trabalho visou validar funcionalmente dois promotores de *Eucalyptus grandis*, o primeiro relacionado a um gene que codifica uma Lacase (denominado *EgLac*) com expressão específica em caule (câmbio), e o segundo relacionado a uma actina (denominado *EgAct*) com expressão ubíqua. Um cassete de expressão contendo o promotor *EgLac* em fusão transcricional com o gene repórter GUS (previamente construído) foi inserido em plantas de *Arabidopsis thaliana*, e uma expressão vascular foi constatada em testes histoquímicos. Em cortes histológicos observou-se que a expressão de GUS ficou restrita ao floema de raízes e folhas. Em paralelo, o gene *EgAct* teve a sua expressão ubíqua validada em diferentes órgãos/tecidos de eucalipto, e a sua região promotora foi amplificada. Um cassete de expressão contendo o promotor *EgAct* em fusão ao repórter GUS foi igualmente inserido em plantas de *A. thaliana*. Análises histoquímicas revelaram uma expressão vascular do gene repórter distribuída ao longo de toda a planta. Por outro lado, a quantificação da expressão de GUS em plantas transformadas revelaram níveis variáveis de acumulação de transcrição de acordo com a idade e o órgão/tecido analisado.

Palavras-chave: Eucalipto; promotor tecido-específico; expressão gênica, Lacase, Actina

Abstract

The rapid expansion of eucalyptus plantations observed in recent years in different Brazilian states increased the technological dependence of the culture, and its inclusion in the biotechnological context is an urgent need. For this, the availability of molecular tools that enable the production of genetically modified trees is necessary. In this context, the present work aimed to functionally characterize two promoters of *Eucalyptus grandis*, the first one related to a gene encoding a laccase (called *EgLac*) with specific expression in stem (cambium region), and the second one related to a gene encoding an ubiquitously expressed actin (called *EgAct*). An expression cassette containing the *EgLac* promoter transcriptionally fused to the GUS reporter gene was inserted into *Arabidopsis thaliana*, and a vascular expression pattern was observed in histochemical tests. Histological sections showed that GUS expression was restricted to the phloem of roots and leaves. In parallel, the ubiquitous expression of *EgAct* was validated using different eucalyptus organs/tissues, and its promoter region was amplified. An expression cassette containing the *EgAct* promoter fused to the GUS reporter was also inserted into *A. thaliana*. Histochemical analysis revealed a vascular expression of the reporter gene distributed throughout the plant. Moreover, quantification of GUS expression in transformed plants revealed variable levels of transcript accumulation according to the age and organ/tissue analyzed.

Keywords: Eucalyptus; tissue-specific promoter, gene expression, Laccase, Actin

ÍNDICE

1. Introdução	11
1.1. Biotecnologia do Eucalipto	12
1.2. Lignina	15
1.3. Promotores	17
1.3.1. Lacase	22
1.3.2. Actina	25
2. Objetivos	27
3. Material e Métodos	27
3.1. Experimentos relacionados com o PROMOTOR com padrão de expressão UBÍQUO (Promotor do gene <i>EgAct</i>)	27
3.1.1. Identificação do EST de eucalipto com padrão de expressão ubíquo	27
3.1.2. Material Vegetal	28
3.1.3. Extração de RNA total de eucalipto	29
3.1.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)	30
3.1.5. Amplificação e clonagem da região promotora do gene <i>EgAct</i>	31
3.1.6. Confirmação da inserção	33
3.1.7. Sequenciamento	34

3.2. Construção do Cassete de Expressão dos Promotores com padrão de expressão Ubíquo e Tecido-Específico	34
3.3. Experimentos de transformação de planta modelo empregando os cassetes construídos.	37
3.3.1. Transformação dos vetores binários em células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.3.2. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i> empregando os cassetes construídos	39
3.3.3. Esterilização e Seleção das sementes de <i>A. thaliana</i> transformadas	40
3.3.4. Extração de DNA genômico e verificação da transformação	41
3.3.5. Análise histoquímica da atividade GUS nas plantas contendo os promotores em estudo	42
3.4. Localização in situ da atividade GUS em cortes histológicos - promotor do gene <i>EgLac</i>	42
3.5. Extração do RNA total de diferentes órgãos/tecidos de <i>A. thaliana</i> transformada como promotor do gene <i>EgAct</i>	43
3.6. Quantificação da expressão de GUS por PCR em tempo real (qPCR) em plantas transformadas com o promotor do gene <i>EgAct</i>	44
3.7. Análises filogenéticas das lacases de Eucalipto.....	46
4. Resultados e Discussão	49
4.1. Validação da expressão do gene <i>EgAct</i>	49

4.2. Confirmação da transformação dos cassetes de expressão em células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
4.3 Confirmação da transformação de <i>A. thaliana</i> com os cassetes construídos	52
4.4. Análise histoquímica da atividade GUS nas plantas transformadas com os promotores em estudo.....	53
4.5. Localização in situ da atividade de GUS em plantas transformadas com promotor do gene <i>EgLac</i>	59
4.6. Quantificação da expressão relativa de GUS em plantas transformadas com o promotor do gene <i>EgAct</i>	60
4.7. As lacases em Eucalipto e suas relações filogenéticas.....	63
4.8. Análise dos elementos cis-regulatórios presentes no promotor do gene <i>EgLac</i>	65
5. Conclusões	67
6. Perspectivas	68
7. Referências bibliográficas	68
8. Anexos	77

1. Introdução

Espécies do gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália e pertencente à família Myrtaceae, foram introduzidas no Brasil em 1825, como espécies ornamentais e quebra-vento (ANDRADE, 1961). Plantas desta família (Myrtaceae) caracterizam-se por possuir caules lenhosos e serem de porte arbóreo ou arbustivo. Algumas características da família são: folhas lanceoladas ou arredondadas, alternadas ou opostas em sua disposição e com estípulas pequenas. A maior parte das espécies conhecidas de eucalipto é composta por árvores de grande porte com altura variável entre 30 e 50 metros, sendo que algumas espécies chegam a 70 metros, como é o caso da espécie *Eucalyptus grandis* (PRYOR, 1976).

A partir de 1903, devido à alta demanda de madeira para construção de estradas de ferro, iniciou-se o plantio de eucalipto em larga escala (ANDRADE, 1961). Características biológicas, como o rápido crescimento (cultura com ciclo de 7 a 10 anos), além de alta produtividade e adaptabilidade, fizeram com que as espécies de grande porte desse gênero (como *E. grandis*) fossem utilizadas, desde então, para fins econômicos em plantios florestais, atendendo aos mercados de móveis (madeira), papel (celulose), alimentícios, higiene e até mesmo farmacêutico (óleos essenciais). Outro destino encontrado para o uso da madeira proveniente do Eucalipto é a geração de energia primária. Com o advento de novas tecnologias, a produção de bio-óleo, celulignina catalítica, gases de síntese (singás) e álcool a partir de celulose vem assumindo um papel de destaque como método complementar aos usos para fins energéticos (Paludzyszyn Filho & Santos, 2011).

O setor florestal produziu mais de 13,9 milhões de toneladas de celulose em 2011, destacando-se como 4º colocado no ranking mundial. Já na produção de papel, o país apresenta-se na 9ª colocação, com uma produção de mais de 10 milhões de toneladas, sendo as exportações da ordem de 7,19 bilhões de dólares, gerando 128 mil empregos diretos (indústria 77 mil, florestas 51 mil) e 575 mil empregos indiretos. O setor conta com um total de 220 empresas com atividade em 540 municípios, localizados em 18 Estados brasileiros (BRACELPA, 2012).

Além do grande benefício econômico proporcionado pelo plantio de eucalipto, destaca-se também o aspecto ecológico. O cultivo de florestas de eucalipto tornou-se um fator benéfico às florestas nativas, uma vez que essa alternativa aumenta o uso de madeira proveniente de reflorestamento, e diminui consideravelmente a pressão sobre as florestas naturais e seu contínuo desmatamento.

1.1. Biotecnologia do Eucalipto

No Brasil, a principal fonte de celulose para a indústria do papel é procedente de plantações de eucalipto. Os primeiros estudos científicos empregando o gênero tinham como propósito a produção de madeira para atender à demanda proveniente das construções de estradas de ferro (Ferreira & Santos, 1997). Atualmente, a área de florestas plantadas está em franca expansão na maioria dos estados brasileiros, ou em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura, apresentando um crescimento médio no país de 5,3% ao ano entre 2009 e 2010. Observou-se uma expansão de mais de 1 milhão de hectares na área plantada nos últimos 6 anos,

crescimento acumulado de 41,1% no período (ABRAF, 2011). Tais dados demonstram que a exploração econômica do eucalipto em diferentes áreas, com diferentes características edafoclimáticas, é totalmente viável.

Posto isso, o observado crescimento da área plantada torna-se proporcional à dependência tecnológica da cultura, já que árvores melhor adaptadas a diferentes condições de clima e solo precisam ser empregadas. Nesse cenário, a inserção do eucalipto no contexto biotecnológico permite vislumbrar uma melhoria na sua posição competitiva, pois tenderia a torná-lo ainda mais produtivo e rentável. Entretanto, para que isso aconteça de forma efetiva faz-se necessária a produção de diferentes ferramentas biotecnológicas, incluindo aquelas que possibilitem o controle mais efetivo da expressão de transgenes de interesse nas espécies utilizadas para plantio.

Dentre as ferramentas moleculares desenvolvidas até o momento para auxiliar o melhoramento genético do eucalipto, destaca-se, dentre outros, o sequenciamento do genoma de *E. grandis*, cujas sequências estão disponíveis no site EucalyptusDB (Public Eucalyptus Genome Resource), e a identificação de um grande conjunto de unigenes (sequências gênicas consenso que representam um único gene) oriundos de madeira disponibilizado no banco de dados EUCAWOOD (<http://www.polebio.scsv.ups-tlse.fr/eucalyptus/eucawood/>). Essas descobertas criaram um recurso valioso para estudos de genômica funcional e melhoramento molecular em gêneros de importância econômica (Rengel *et al.*, 2009), e garantiram uma ampla e rápida divulgação de dados genômicos de eucalipto na comunidade científica. Além disso, tais bancos representam uma importante fonte de

identificação e clonagem das regiões promotoras de genes com padrão de expressão conhecido, tema de estudo do presente trabalho.

Tais bancos permitem também a realização de análises genômicas comparativas entre diferentes espécies. Por exemplo, uma análise comparativa da família a qual pertence o gene *CeSA*, que codifica as subunidades catalíticas de um complexo de proteínas responsáveis pela deposição de celulose na parede celular vegetal (Celulose Sintase), realizada em três gêneros de angiospermas: *arabidopsis*, *Populus* e *Eucalyptus*, identificou sequências cis-regulatórias altamente conservadas e relacionadas com a biossíntese de celulose em plantas vasculares (Creux *et al.*, 2008). Igualmente, mostrou-se que a expressão vascular determinada pelo promotor do gene *EgCAD2*, que codifica a Cinamil álcool desidrogenase em *Eucalyptus gunnii*, se conserva em tabaco e *Populus*, como descrito por Lauvergeat e colaboradores (2002). Esses resultados representam exemplos de conservação de processos regulatórios em diferentes espécies. Adicionalmente, os genes que codificam as enzimas Cinamil álcool desidrogenase (*CAD*) e Cinamoil-CoA-redutase (*CCR*) de *E. gunnii* foram expressos em *A. thaliana* de maneira coordenada em xilema primário e secundário (segundo Baghdady *et al.*, 2006), reforçando o sinergismo de enzimas ativas em células no processo de lignificação.

Os principais programas de melhoramento genético de Eucalipto têm como objetivo aumentar ganhos de características relacionadas, principalmente, à otimização da fabricação de papel e celulose. Segundo dados da Embrapa, empresas de base florestal voltadas para a produção de papel e celulose são aquelas que detêm os maiores investimentos do setor. Objetiva-se nesses

programas obter indivíduos aptos à clonagem que apresentem madeira com baixo teor de lignina não reativa ao processo de polpação (processo pelo qual a madeira é reduzida a uma massa fibrosa). Para tal, os programas de melhoramento genético se utilizam de cruzamentos entre clones produtivos, sendo a seleção clonal o procedimento estratégico mais empregado (Paludzyszczym Filho & Santos, 2011).

Nesse contexto, Harakava (2005) identificou genes considerados bons candidatos para investigação detalhada de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e comparação de níveis de expressão entre as linhagens de eucalipto variando em quantidade e qualidade de lignina. Este estudo estabeleceu um quadro para futuras investigações, sobre o nível de expressão gênica, expressão de proteínas e ensaios enzimáticos, polimorfismos de sequência e de engenharia genética relacionada à biossíntese da lignina.

1.2. Lignina

A lignina é o segundo biopolímero terrestre mais abundante (depois da celulose), representando cerca de 30% do carbono orgânico na biosfera. A adaptação ao ambiente terrestre pelas plantas foi possível graças à aquisição da capacidade de síntese de lignina, o que proporcionou maior rigidez, impermeabilidade e resistência aos tecidos vegetais (Chabanne *et al.*, 2001). A presença de lignina permite ainda o transporte de água através do sistema vascular (Sarkanen & Ludwig, 1971). Sua constituição é difícil de ser estabelecida, devido a complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas

por diferentes tipos de ligações, além das modificações estruturais que ocorrem durante seu isolamento das paredes celulares (Moraes, 1991).

A indústria química de papel e celulose utiliza-se de toneladas de madeira como matéria prima, e nesse caso, a retirada da lignina se faz necessária (Glasser *et al.*, 1989). No processo de deslignificação da madeira forma-se uma pasta celulósica caracterizada como a maior fonte de lignina disponível. Sua coloração (da pasta celulósica) pode variar entre tons de marrom, de acordo com o processo de extração utilizado, por esse motivo a pasta deve passar por uma etapa de branqueamento a fim de se obter papel extremamente branco, que apresenta maior valor comercial. A etapa de branqueamento conta com ataques químicos e lavagens, principalmente com compostos clorados que oxidarão a lignina, resultando em um dejetos líquido rico em organoclorados (cancerígenos) e outros como clorofenóis, ácidos fenol-carboxílicos, ácidos dicarboxílicos e hidrocarboneto (Smith *et al.*, 1989), o que gera uma grande preocupação ecológica.

Um caminho a seguir, nesse caso, seria a utilização de recursos biotecnológicos a fim de aperfeiçoar o processo de deslignificação, uma vez que o entendimento da manipulação de elementos envolvidos na regulação dos genes responsáveis pela síntese de lignina possibilitaria a obtenção de plantas mais adequadas aos diversos fins industriais (Lewis & Sarkanen, 1998). Ademais, estudos relacionados à caracterização de enzimas e genes envolvidos na rota metabólica da biossíntese de lignina tendem a contribuir para o entendimento dos mecanismos de regulação envolvidos em sua síntese (Fukuda, 1996), além de possibilitar a

verificação de alterações do processo de lignificação por modulação da atividade enzimática (Lauvergeat, 1995).

1.3. Promotores

Promotores são sequencias de DNA específicas essenciais para o início da transcrição, sendo reconhecidos por fatores de transcrição gerais e específicos que recrutam a RNA polimerase para realizar a síntese dos RNAs. Do ponto de vista biotecnológico, é através da região promotora que a expressão do transgene pode ser regulada, o que proporciona um controle mais preciso (Twyman, 2003). Promotores utilizados em biotecnologia de plantas dividem-se tradicionalmente em três categorias: constitutiva (ativo continuamente na maioria ou em todos os tecidos), espaço-temporal (tecido-específico ou atividade restrita a estágio específico) e induzível (regulamentado através da aplicação de um produto químico ou um sinal físico externo) (Potenza *et al.*, 2004).

Sabe-se que o maior nível de regulação ocorre no início da transcrição e envolve a região proximal do promotor denominada *core* (promotor-núcleo) (Singh, 1998). É nesta região que se encontra o TATA-box, presente em praticamente todos os promotores de genes de eucariotos transcritos pela RNA polimerase do tipo II, e localizado normalmente à cerca de 25 nucleotídeos antes do ponto de início da transcrição (+1). Pode-se encontrar nessa região também, um elemento iniciador que ocorre adjacente ao local de início da transcrição, possuindo a sequência consenso YYCARR. Nesse caso, ambos os elementos ajudam a posicionar o fator de transcrição geral TFIID, que contém a proteína de ligação à TATA (TBP) e vários

fatores de associação à TBP (TAFs). No entanto, em alguns promotores tanto a região TATA-box quanto o iniciador podem estar ausentes. Neste caso, os genes sob o seu controle tendem a possuir múltiplos sítios de iniciação de transcrição refletindo uma incapacidade para posicionar precisamente TFIID (Twyman, 2003).

Ao lado da região *core* existem ainda outras sequências regulatórias que se encontram agrupadas em clusters. Estas estão localizadas a montante do promotor-núcleo e se estendem por 100-200 pares de bases ao longo da região 5'. Estas sequências são reconhecidas por fatores de transcrição que interagem com o chamado "Complexo de Iniciação Transcricional", facilitando a sua montagem, melhorando a estabilidade e aumentando a eficiência de escape do complexo do promotor, uma vez que a maquinaria transcricional funciona através de um mecanismo de disparo.

Sequências promotoras são semelhantes em todos os órgãos/tecidos da planta. Todavia, o que determina se o gene é expresso ou não é a disponibilidade e a atividade dos fatores de transcrição. Aqueles, que se ligam aos promotores constitutivos, estão disponíveis e ativos o tempo todo, enquanto que os de ligação aos promotores de genes com regulação espaço-temporal e/ou induzíveis são eles próprios racionados e disponibilizados apenas em certos tecidos ou fases de desenvolvimento, ou ainda em resposta a sinais externos. São esses fatores que proporcionam o principal mecanismo de regulação da transcrição. Outras sequências regulatórias chamadas enhancers, localizadas há muitos pares de bases de distância da região promotora, também participam do processo de regulação da expressão gênica. Os enhancers são encontrados tanto a montante quanto a jusante

ou mesmo dentro dos íntrons dos genes que controlam. Devido à sua distante localização em relação ao promotor *core*, as interações com o complexo de iniciação da transcrição são alcançados por dobra do DNA interveniente (íntron).

A região promotora é influenciada também pela presença de ativadores e repressores da transcrição, que funcionam de várias maneiras influenciando a estabilidade do complexo de iniciação. Alguns são proteínas de ligação ao DNA, enquanto outros interagem ao nível da proteína. Existem os que podem formar ligações diretas com o complexo de iniciação, ou contatos indiretos através de uma ponte mediadora. Enquanto outros, alteram estrutura da cromatina ou introduzem curvas ou dobras no DNA promotor para facilitar ou perturbar possíveis interações. Algumas proteínas reguladoras podem atuar quer como ativadores ou repressores dependendo do contexto do promotor e das outras proteínas que estão presentes (Peremarti *et al.*, 2010).

Grandes avanços têm sido obtidos com a utilização de promotores muito bem conhecidos e caracterizados, como é o caso do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor e dos promotores dos genes envolvidos na síntese de opinas (octopina e nopalina) de *Agrobacterium tumefaciens*. Todavia, os transgenes sob o controle de tais promotores são geralmente expressos de forma ubíqua, ou seja, em todos os órgãos e/ou tecidos da planta (Sanders *et al.*, 1987; Sunilkumar *et al.*, 2002). O promotor 35S, por exemplo, por possuir uma função estimulante forte, tem potencial para ser um impedimento em projetos voltados para a obtenção de transgênicos comerciais, nos quais o controle preciso da expressão do transgene é essencial (Singer *et al.*, 2010). Uma alternativa mais adequada envolveria o emprego de

promotores capazes de conduzir uma regulação espaço-temporal mais precisa da expressão. Nesse contexto, o uso de promotores de genes com expressão tecido-específica e relacionados com a espécie alvo seria ideal.

Diversos exemplos de promotores com padrões de expressão característicos encontram-se descritos na literatura. Em girassol, por exemplo, o promotor HaFAD2-1 é tão forte quanto o promotor 35S. Embora sua atividade ocorra apenas na fase embrionária, ele pode ser considerado um promotor forte de semente, altamente específico e útil para aplicações biotecnológicas (Zavallo *et al.*, 2010). No caso dos cereais, os promotores de genes de resistência denominados PRPI (tecido específicos e indutíveis por ferimento/patógeno) se mostraram úteis no direcionamento específico e acúmulo de proteínas que conferem resistência a patógenos em tecidos mais vulneráveis do desenvolvimento e da germinação (Kovalchuk *et al.*, 2010).

No caso do gênero *Eucalyptus*, em *E. gunnii* foram identificados elementos MYB conservados em promotores dos genes EgCAD2 e EgCCR responsáveis por codificar as enzimas CCR e CAD que catalisam, respectivamente, os passos finais da biossíntese de monolignol, um monômero de ligninas fenólicas. Esses elementos regulatórios são cruciais tanto para a formação de complexos DNA-Proteína em experimentos de gel shift, como para ativação transcricional dos promotores nos tecidos vasculares. No mesmo estudo, a descoberta de um cis-elemento regulatório que modula o equilíbrio entre dois complexos DNA-proteína *in vitro*, considerado importante para a expressão de EgCAD2 na zona cambial, possibilitou um melhor entendimento da regulação da via de síntese da lignina (Rahantamalala *et al.*, 2010).

Na mesma linha, a realização de análises de deleção e experimentos de ganho de função feitos por Lacombe e seus colaboradores (2000) possibilitaram a identificação das sequências necessárias para regular a expressão do promotor do gene EgCCR (de *E. gunnii*) que apresentou atividade mais forte nos órgãos lignificados.

Apesar da grande contribuição fornecida pelos mencionados estudos envolvendo os promotores dos genes EgCCR e EgCAD2, a existência de patentes associadas a estes genes, bem como de suas regiões promotoras, inviabiliza o livre emprego da informação relacionada. As sequências de DNA codificando a enzima CCR encontram-se patenteadas desde 2000 (Patente US6015943 por Boudet e colaboradores). Promotores de *Pinnus radiata* e *E. grandis* capazes de dirigir uma expressão preferencial em sistemas vasculares também se encontram patenteados desde 2004 (Patente US20040163146 por Phillips e colaboradores). Além dessas patentes, a modificação da via de biossíntese de lignina em plantas empregando as sequências de nucleotídeos que codificam as enzimas 4-hidroxicinamato-CoA ligase (4 CL), CCR e CAD foi patenteada em 2008 (Patente US7429649 por Spangenberg e colaboradores). Diante do exposto, fica evidente que a descoberta de novos promotores de genes com expressão vascular se faz necessária, especialmente se considerarmos que o uso dos promotores atualmente disponíveis encontra-se protegido por patentes.

Estudos relacionados à descoberta e análises de promotores com expressão órgão/tecido-específica favorecem um aprendizado mais eficaz sobre os mecanismos de regulação da expressão gênica e os processos moleculares

envolvidos na diferenciação tecidual. Além disso, do ponto de vista aplicado é extremamente desejável que a região promotora tenha origem em espécies filogeneticamente próximas, uma vez que a expressão do gene conta com sistemas regulatórios únicos, podendo agir de forma imprevisível em espécies heterólogas distantes (Tyagi, 2001) ou sofrer silenciamento (Cammue *et al.*, 2005). Tal afirmação é válida tanto para promotores com padrão de expressão tecido-específico como ubíquo. Ressalta-se, ainda, que ao aspecto técnico associado ao uso de promotores tecido-específicos agrega-se a maior segurança relacionada à produção e comercialização de organismos geneticamente modificados cuja expressão do transgene é mais específica e controlada.

Levando-se todos esses aspectos em consideração, no presente estudo deu-se preferência por investigar os promotores de dois genes de Eucalipto, um com expressão predita em sistema vascular (referente a uma lacase), e outro com expressão ubíqua (referente a uma actina).

1.3.1. Lacase

As lacases (EC 1.10.3.2), identificadas primeiramente na resina da árvore de laca (*Rhus vernicifera*) (Yoshida, 1883), são enzimas cujas moléculas, monômeros ou dímeros de glicoproteínas, geralmente contêm 4 átomos distribuídos em 3 sítios redox por monômeros (Gianfreda *et al.*, 1999). Catalisam a oxidação de diversos grupos fenóis (aminofenóis, polifenóis) poliaminas e ligninas, além de realizar a redução de dioxigênio molecular para água (Solomon *et al.*, 1996).

Em *A. thaliana*, a família gênica das lacases é composta por 17 membros (nomeados AtLAC1-17) que apresentam padrões específicos de expressão e certo grau de redundância. Análises de RT-PCR mostraram que 15 lacases apresentam certo nível de expressão na maioria dos órgãos/tecidos, sendo que apenas duas (LAC6 e LAC16) não foram detectadas em todos eles. Os padrões de expressão foram classificados em três grupos: expressão ubíqua (LAC2, LAC4, LAC5, LAC10-LAC12); expressão em raízes e órgãos reprodutivos (LAC1, LAC3, LAC7, LAC8 e LAC15); expressão em raízes (LAC9 e LAC13), e restrita a órgão reprodutivo (LAC14). Além destes, a expressão em fases específicas do desenvolvimento foi observada no caule (LAC3 e LAC7) e nas folhas (LAC8 e LAC15). Em plantas jovens, LAC15 não mostrou qualquer expressão e a expressão de LAC1 não foi detectada nas vagens (Turlapati *et al.*, 2011).

Em 1993, Bao e colaboradores descreveram uma lacase purificada a partir de paredes celulares em diferenciação de xilema de pinho. Os dados obtidos revelaram uma correlação entre o tempo e o local de purificação desta lacase com a formação de lignina e oxidação de monolignóis, sugerindo a participação dessa enzima na biossíntese de lignina. Outrossim, o relato de uma lacase purificada em tecido lignificado de angiospermas (*Populus euramericana*) baseada, da mesma forma, em sua estreita correlação espacial com a lignificação, bem como em suas propriedades bioquímicas, forneceu provas '*in vitro*' da associação funcional dessas enzimas com a lignificação (Ranocha *et al.*, 1999). Em caule de mudas de milho, a atividade de uma lacase foi detectada no floema, estando a mesma relacionada à citocininas receptoras de elétrons. Neste caso, a enzima é responsável pela oxidação de um

composto aromático (4-metilcatecol) que atua como aceptor de elétrons de uma citocinina específica (Galuszka *et al.*, 2005).

Análises de microarranjos de micro RNA (miRNA) mostraram que a deficiência de cobre em *Brassica napus* promoveu um aumento de mais de quatro vezes na acumulação na seiva do floema dos miRNAs 397 (presente em raízes) e 408 (presente em folhas) (Buhtz *et al.*, 2010). Estes miRNAs são responsivos a cobre (Cu) e têm as lacases como alvo (Buhtz *et al.*, 2008). Tais dados indicam que este mecanismo é utilizado no resgate de Cu visando a formação de plastocianina, por exemplo, que também conta com Cu em sua cadeia e atua como proteína chave na fotossíntese (Abdel-Ghany e Pilon, 2008). Células formadoras de madeira são heterotróficas e têm que importar toda a sua energia e muitos outros componentes para a biossíntese de lignina. A fenilalanina (Phe), precursor para a biossíntese de lignina, ou é importado do floema ou sintetizado de novo pelo plastídio localizado na via do chiquimato (Novaes *et al.*, 2010).

Nesse contexto, existem ainda evidências de que a função das lacases durante os primeiros estágios de lignificação é polimerizar monolignóis em oligolignóis, e que nesse caso, peroxidases poderiam atuar quando altas concentrações de H₂O₂ fossem produzidas nas fases posteriores do desenvolvimento do xilema (Sterjiades *et al.*, 1996).

Devido à mencionada correlação espaço-temporal entre a atividade da lacase e locais altamente lignificados, vislumbrou-se a possibilidade de identificar o gene correspondente em Eucalipto com o objetivo de clonar a sua região promotora. A disponibilidade do referido promotor permitiria o seu uso como ferramenta para

promover uma expressão restrita ao sistema vascular. Nesse contexto, um EST de eucalipto (EGJFRT3316D07.g) codificando uma lacase foi identificado no banco de dados do FORESTs e sua expressão em tecido cambial foi previamente validada em nosso laboratório empregando RT-PCR.

1.3.2. Actina

Actina é codificada por famílias gênicas na maioria dos eucariotos multicelulares. Estudos evolutivos sugerem que as subclasses de diferentes actinas divergiram muito cedo na evolução das plantas vasculares, talvez de 300 a 500 milhões de anos atrás (Hightower e Meagher, 1986). O número de genes codificadores de actina em plantas é bastante variável (Šljajčeroová *et al.*, 2012). Em *A. thaliana*, por exemplo, cerca de 10 genes (incluindo 2 pseudogenes) foram identificados em seu genoma, sendo o mesmo observado no genoma de arroz. Em arabidopsis, as actinas são classificadas em vegetativas (ACT2/8 e ACT7) ou reprodutivas (ACT1/3, ACT4/12, and ACT11) de acordo com o seu padrão de expressão e funcionalidade (McKinney e Meagher, 1998).

A caracterização molecular de uma subclasse de actina composta por dois genes funcionais em arabidopsis (ACT2 e ACT8) foi empreendida. Um padrão de expressão forte e constitutivo em todos os tecidos vegetativos foi observado, sendo tal padrão consideravelmente diferente de qualquer outro padrão de expressão determinado para outras subclasses de actina descritas (Yong-Qiang *et al.*, 1996). Cabe lembrar que a maioria dos genes codificadores de actina é expressa diferencialmente em plantas apresentando níveis variados de expressão de acordo

com o órgão/tecido analisado (Meagher & Williamson, 1994). Posto isso, foi proposto que os genes desta família, antigos e divergentes, foram mantidos no genoma da planta por possuírem padrões distintos de regulação e / ou codificação de proteínas com funções distintas.

Uma outra subclasse de genes codificadores de Actina em *arabidopsis* (genes AtAct1 e AtAct3) foi caracterizada com o propósito de se encontrar uma expressão diferencial entre genes da mesma subclasse. A expressão tecido-específica detalhada foi examinada em vários estágios de desenvolvimento, e verificou-se que ambos os genes codificam proteínas quase idênticas. Esses genes foram expressos preferencialmente em pólen maduro e no tubo polínico bem como em todos os órgãos primordiais (Yong- Qiang *et al.*, 1996). Corroborando com esse estudo, em soja, uma família composta por três diferentes subclasses de actina muito divergentes umas das outras foi descrita (Hightower e Meagher, 1986).

Promotores de genes codificadores de actina têm sido utilizados na construção de cassetes de expressão visando à transformação de plantas de interesse. O promotor do gene OsAct1 mostrou-se de 5 a 10 vezes mais ativo do que o promotor do gene Adh1 de milho em transformações em arroz, sugerindo-o como um promotor altamente eficiente (McElroy *et al.*, 1990). Ainda em arroz, observou-se que o promotor do gene OsAct2 também é capaz de conferir uma expressão constitutiva em arroz transgênico (He *et al.*, 2009).

Devido ao seu papel fundamental na constituição do citoesqueleto da célula vegetal e do caráter ubíquo de algumas das isoformas de actina, as regiões promotoras dos genes correspondentes são ótimas candidatas para viabilizar uma

expressão generalizada e constitutiva em plantas geneticamente modificadas (Seagull, 1989).

2. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

A) Caracterizar funcionalmente o promotor de um gene que codifica uma Lacase (*EgLac*) com expressão em câmbio de *Eucalyptus grandis*.

B) Isolar e caracterizar funcionalmente o promotor de um gene que codifica uma Actina em *Eucalyptus grandis* (*EgAct*), visando sua possível utilização como promotor ubíquo.

3. Material e Métodos

3.1. Experimentos relacionados com o PROMOTOR com padrão de expressão UBÍQUO (Promotor do gene *EgAct*)

3.1.1. Identificação do EST de eucalipto com padrão de expressão ubíquo

O EST Eucgr.l00241.1 com padrão de expressão predito como ubíquo foi selecionado em análises *in silico* realizadas junto ao banco de dados FORESTs e *EucalyptusDB* (<http://eucalyptusdb.bi.up.ac.za/>). Para a seleção nesses bancos, a sequência de nucleotídeos de um gene que codifica uma actina do tipo 2 em *A. thaliana* (Act2; AT3G18780) foi usada como isca. Em paralelo, os dados de análise *in*

silico gerados por Vicentini *et al.*, (2005) foram usados para a predição do perfil de expressão em eucalipto.

A fim de se realizar a validação da expressão ubíqua do referido gene por PCR em tempo real, oligonucleotídeos (primers) foram desenhados a partir da sequência do EST disponível no banco de dados. Esses foram desenhados utilizando o software *PerlPrimer* v1. 1.19 (Copyright © 2003-2010 Owen Marshall) e avaliados quanto à especificidade utilizando o banco de dados do *Eucalyptus* Genome Database (<http://eucalyptusdb.bi.up.ac.za/>), e quanto a formação de dímeros empregando o programa IDT SciTools real time PCR (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>). Na Tabela 01 estão listados os oligonucleotídeos utilizados para a validação por PCR tempo real.

Tabela 01- Oligos utilizados para validação por qPCR.

Actina RT F	5'GTCTTTCCCAGTATTGTTGGT3'
Actina RT R	5'AACATAGGCATCCTTCTGAC 3'

3.1.2. Material Vegetal

Para validar a expressão órgão-específica do EST selecionado nas análises *in silico* (correspondente ao gene *EgAct*) foram utilizadas amostras de folha, caule, raiz e botão floral de *Eucalyptus grandis*. As amostras de raiz e caule foram coletadas de mudas de ~20 dias enquanto que as folhas foram coletadas de mudas

e plantas adultas (1 ano). As coletas foram realizadas no jardim clonal e em campo experimental da empresa Suzano Papel e Celulose em Itapetininga – SP.

As análises funcionais dos promotores em estudo foram realizadas em plantas de *Arabidopsis thaliana* Col-0 mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 18°C e fotoperíodo de 18 horas de luz e 8 horas de escuro. A utilização desta planta modelo nos experimentos de transformação deveu-se principalmente as suas características biológicas que facilitam o desenvolvimento da pesquisa em curto prazo, como: um ciclo de vida relativamente curto (3 meses); produção de um grande número de sementes; facilmente cultivável em espaços restritos; além de se tratar de um organismo diplóide.

3.1.3. Extração de RNA total de eucalipto

O RNA total proveniente de diferentes órgãos de *Eucalyptus grandis* empregado na validação da expressão do EST selecionado nas análises *in silico* foi extraído através da metodologia descrita por Chang *et al.* (1993), modificada por Korimbocus *et al.* (2002). Foram utilizados aproximadamente 100 mg de tecido macerado em nitrogênio líquido, com posterior solubilização em 500 microlitros (µl) do tampão de extração CTAB pré-aquecido e incubado por 10 minutos a 65°C. Foram adicionados 500 µl de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico - 24:1) e homogeneizado. A amostra foi então centrifugada a 12000g por 10 min à temperatura ambiente, o sobrenadante coletado, e o passo anterior repetido. Um volume de cloreto de lítio (LiCl 5M) foi adicionado ao volume do sobrenadante coletado e o RNA total foi precipitado a 4°C por no mínimo 1 hora com posterior centrifugação a 12000g por 30 min (4°C). O sedimento foi lavado

em 200 µl de TE-SDS 1%, 100 µl de NaCl 5M e 300 µl de isopropanol. A amostra foi precipitada por 30 min a -20°C e centrifugada a 12000g por 20 min (4°C). Realizou-se uma lavagem com 1 ml de etanol 70% com posterior centrifugação a 7500g por 5 min (4°C), sendo o precipitado ressuspenso em H₂O Milli-Q autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato - DEPC). Alíquotas das amostras foram misturadas ao tampão de carregamento e avaliadas quanto à sua integridade em gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídio.

3.1.4. Síntese de cDNA e PCR em tempo real (qPCR)

Dois microgramas (µg) de RNA total extraído dos diferentes órgãos/tecidos foram utilizados nas análises de RT-qPCR. As amostras foram tratadas com DNase I- RNase free, segundo as recomendações do fabricante (MBI Fermentas), visando degradar todo DNA genômico presente na amostra. Após o tratamento com DNase I, cada alíquota de RNA total foi submetida à transcrição reversa (RT) empregando a SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). A reação de síntese de cDNA seguiu as recomendações do fabricante sendo composta de 1 µg de RNA total, 4µl de Master Mix e água DEPC para completar 20 µl. Todo o procedimento foi realizado no gelo empregando até a ciclagem: 25°C por 5 minutos; 42°C por 30 minutos; 85°C por 5 minutos e 4°C por 20 minutos.

Após a RT, o cDNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop e diluído para uma concentração final de 30 ng/µl. Para validar a expressão gênica do candidato selecionado usando qPCR utilizou-se o kit Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix(2X) (Fermentas). As reações foram preparadas para um volume total de

10 µL, em duplicatas, em placa de 96 poços, utilizando os seguintes reagentes: 5 µl (1X) de SYBR Green/ROX MasterMix (2x), 0,5 µl de cada oligonucleotídeo (Forward e Reverse - 10 mM), 1 µl de cDNA (30 ng/ µl) e 3,4 µl de água deionizada. O controle negativo foi realizado adicionando-se água deionizada livre de RNase ao invés de cDNA, visando à certificação da ausência de qualquer tipo de contaminação nos reagentes.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada em um termociclador óptico (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos, sendo pareamento e extensão realizados a 60°C por 1 minuto. No final do processo, para a quantificação dos dados, foi realizado um ciclo suplementar de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C. Posteriormente os dados ópticos foram analisados no programa 7300 System Software (Applied Biosystems).

Ao término das reações obteve-se a representação gráfica (Amp Plot) e numérica (Ct, Threshold Cycle) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação. A eficiência da reação foi determinada por meio de diluições seriadas (1:1, 1:5, 1:25 e 1:125). A curva padrão foi elaborada a partir do valor de Ct de cada alíquota, e o declive (slope) da reta foi determinado. Este valor foi então inserido na seguinte formula: $E = (10^{-1/\text{slope}}) \sim 100$ para se calcular a estimativa de eficiência (E) do ensaio de PCR em tempo real.

3.1.5. Amplificação e clonagem da região promotora do gene *EgAct*

Uma vez validada a expressão do gene candidato selecionado (*EgAct*), sua região promotora foi recuperada no banco de dados *EucalyptusDB*. Como um limite padrão de tamanho da região promotora a ser clonada, estabeleceu-se utilizar os 1300 nucleotídeos (nt) localizados à montante do ATG iniciador da região codificadora predita, incluindo a região 5' não traduzida (UTR). Para tal utilizou-se o programa Softberry. A sequência da região escolhida foi analisada quanto a presença de elementos *cis*-regulatórios empregando os bancos PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) e PlantPan (http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seq_analysis_total.php). Em seguida, a região promotora selecionada foi analisada quanto a presença de sítios de enzimas de restrição pelo programa NEBcutter V2.0 BioLabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

A região promotora foi então amplificada a partir de DNA genômico de eucalipto empregando iniciadores contendo sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *NcoI* (sublinhados nas sequências dos oligos) para posterior clonagem em vetor binário. Os oligos desenhados foram: Act *EcoRI* (5' CGAATTCCGCTCATCCCGGCCGAGAA3') e Act *NcoI* (5' CATGCCCATGGTTTCAAAAGATATTAAC3'). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico de eucalipto, 2,5 U de *Pfu* DNA Polymerase, 0,5 µl de cada oligo (10 µM), tampão da enzima *Pfu* com MgSO₄, 2 mM de MgSO₄, 0,5 µl de um mix de dNTP (10 mM) e água para completar 25 µl. A ciclagem foi realizada em termociclador Eppendorf com as seguintes etapas: 95°C por 5 minutos; 95°C por 45 segundos; 60°C por 1 minuto; 72°C por 2 minutos; 72°C por 10 minutos.

Após a amplificação, os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

O fragmento promotor amplificado por PCR foi então purificado em gel e clonado no vetor pGEM®-T Easy. A reação de ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase conforme recomendações do fabricante (MBI Fermentas) para posterior transformação de bactérias, sequenciamento e confirmação da inserção.

Após a ligação, células competentes da cepa DH10B de *Escherichia coli* (Sambrook *et al.*, 1989) foram transformadas adicionando-se 10 µl da ligação em 100 µl de células competentes, seguido de um período de incubação em gelo por 30 minutos. A amostra foi então incubada a 42°C por 90 segundos, e 200 µl de meio LB (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v em água deionizada, pH 7,0) foram adicionados ao tubo, com posterior incubação a 37°C por 1 hora a 200 rpm. Em seguida a cultura foi plaqueada em meio LB sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select* Agar em água deionizada, pH 7,0), contendo ampicilina (100 mg/ml). A placa foi incubada a 37°C por 16 horas.

3.1.6. Confirmação da inserção

As colônias transformadas foram transferidas para meio líquido LB (3 ml) contendo ampicilina (1 mg/ml), onde permaneceram sob agitação constante de 160 rpm e temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas. Após esta etapa de crescimento,

as bactérias foram acondicionadas adicionando-se glicerol líquido autoclavado (15%; v/v) a 1 ml da referida cultura, com posterior estocagem em freezer -80°C. O restante do volume foi utilizado para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) visando confirmar por digestão (empregando as enzimas usadas nas clonagens), e sequenciamento pelo método de Sanger, a presença do fragmento clonado. A construção contendo o promotor do gene *EgAct* foi verificada usando as enzimas *EcoRI* e *NcoI*. A reação inicial foi composta de 10 µl de DNA (200 ng/µl), 5U de *EcoRI*, tampão Tango 2X e água para completar 20 µl. A reação permaneceu a 37°C por 2 horas, e a enzima foi inativada a 65 °C por 10 minutos. A segunda reação foi realizada usando 5U de *NcoI*, o produto da reação anterior (20 µl), tampão Tango 2X e água para 30 µl. Após as digestões, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% corada com brometo de etídeo.

3.1.7. Sequenciamento

O produto clonado em vetor *pGEM-Teasy* foi sequenciado utilizando-se o kit comercial *Big Dye* versão 3.1 (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático de DNA modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems) utilizando os primers T7 e SP6.

3.2. Construção do Cassete de Expressão dos Promotores com padrão de expressão Ubíquo e Tecido-Específico

Para a construção dos cassetes de expressão contendo os promotores *EgAct* e *EgLac* foi utilizado o vetor binário pCAMBIA-1381z (Cambia), que contém um íntron inserido na região codificadora do gene repórter *uidA* (GUS), o que impossibilita a transcrição do transgene em organismos procariotos. A construção teve a seguinte conformação: promotor de interesse (*EgLac* ou *EgAct*) em fusão transcricional ao gene GUS e sob controle do terminador do gene da nopalina-sintetase (NOS) (Figura 1).

Cabe ressaltar que um vetor pGEM-TEasy contendo o promotor do gene *EgLac* já se encontrava disponível e validado em nosso laboratório (anexo 1). Sua região promotora foi amplificada a partir de DNA genômico de eucalipto, gerando um fragmento de 1381 pb (incluindo a região 5' UTR) que foi utilizado para a construção de um cassete de expressão em vetor binário visando à transformação de planta modelo.

Bactérias transformadas com o vetor pGEM-Teasy contendo, respectivamente, os fragmentos correspondentes aos promotores em estudo foram crescidas em meio líquido LB (3 ml) contendo ampicilina (1 mg/ml), sob agitação constante de 160 rpm e temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas. Após o crescimento, a cultura foi utilizada para a extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), sendo este digerido empregando as enzimas usadas na clonagem de cada região promotora em pGEM-Teasy (*Bam*HI e *Nco*I no caso do promotor do gene *EgLac* e *Eco*RI e *Nco*I no caso do promotor do gene *EgAct*). O vetor pCAMBIA-1381z foi igualmente digerido.

A reação de digestão dos dois vetores seguiu os seguintes passos: digestão com *Nco*I - 10 µl de DNA plasmidial (200 ng/µl), 5U de *Nco*I, tampão Tango 1X e água para completar 20 µl. A reação permaneceu a 37°C por 2 horas, e a enzima foi inativada a

65°C por 10 minutos. A segunda reação de digestão foi realizada de acordo com cada região promotora de interesse. No caso do promotor do gene *EgLac* utilizou-se 5U de *Bam*HI, o produto da reação anterior (20 µl), tampão Tango 1X e água para 30 µl. Já no caso do promotor do gene *EgAct* utilizou-se 5U de *Eco*RI, o produto da reação anterior (20 µl), tampão Tango 2X e água para 30 µl. Após as digestões, os produtos das reações passaram por eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo, e os fragmentos foram recortados do gel e purificados empregando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Utilizou-se a enzima T4 DNA ligase conforme recomendações do fabricante (MBI Fermentas) para reações de ligação.

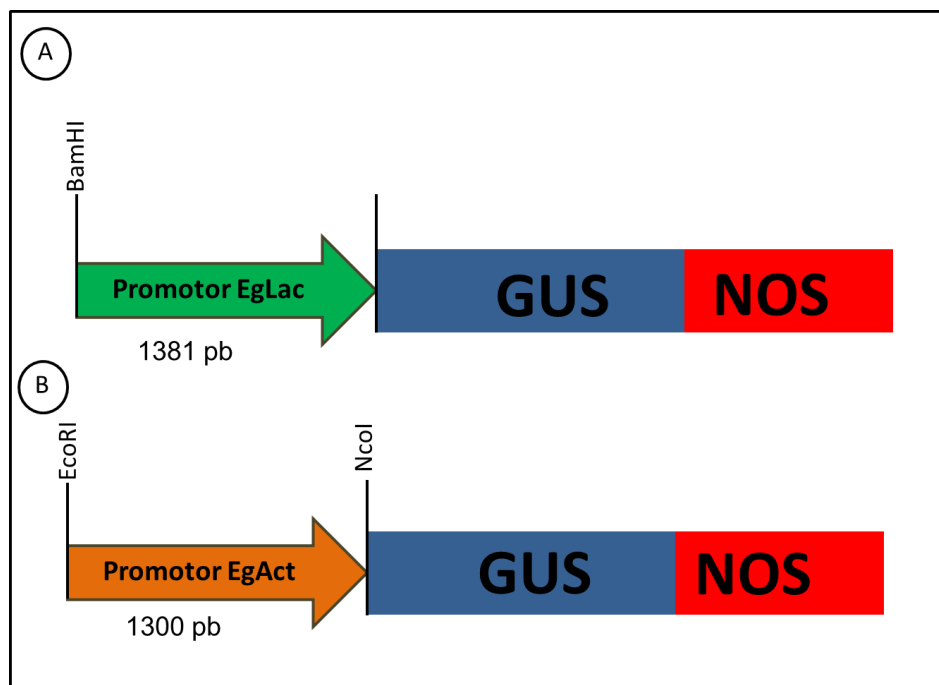


Figura 1- Representação esquemática dos cassetes de expressão contendo os promotores de interesse em fusão transcricional com o gene GUS. Promotor *EgLac* – promotor do gene que codifica uma Lacase; B) Promotor *EgAct* - promotor do gene que codifica uma Actina. O terminador da nopalina sintetase está representado (NOS).

Após a ligação, células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989) foram transformadas empregando choque térmico. As bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB sólido adicionado de 100 μ g/ml de canamicina, sendo as placas incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

3.3. Experimentos de transformação de planta modelo empregando os cassetes construídos.

3.3.1. Transformação dos vetores binários em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Os cassetes de expressão contendo o gene *uidA* sob controle, respectivamente, dos promotores ubíquo (promotor do gene *EgAct*) e câmbio-específico (do gene *EgLac*), ambos inseridos no vetor binário pCAMBIA-1381z, foram utilizados na transformação de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV 3101. O vetor binário pCAMBIA-1381z possui gene de resistência a canamicina como agente de seleção bacteriano. A transformação de células competentes por eletroporação foi baseada na metodologia de Brasileiro e Carneiro (1998). Uma colônia de *A. tumefaciens* foi isolada e transferida para 3 ml de meio YEB (5 g extrato de carne, 1 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, 5 g de sacarose, 240 mg de MgSO₄, pH 6,8). Incubou-se a amostra a 28°C por 16 horas sob a agitação de 100 a 150 rpm. A cultura foi então transferida para dois tubos de microcentrífuga (1,5 ml cada um) e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto. Após essa etapa, as células foram ressuspensas delicadamente em meio 0,5 ml de HEPES/KOH 1 mM, mantido a 4°C e centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto, sendo essa lavagem repetida por 3 vezes. As células foram novamente ressuspensas em 0,5 ml de glicerol 10%, mantido a 4°C, e centrifugadas por 1 minuto, a 12.000 rpm. Após a formação do sedimento bacteriano, as células foram ressuspensas em 20 µl de glicerol 10% (4°C) e o conteúdo dos dois tubos foram unidos (total de 40 µl).

Para a transformação, adicionou-se ao tubo 1 µg de DNA plasmidial que foi misturado delicadamente e incubado no gelo por 2 minutos. A suspensão de 40 µl foi transferida para a cuveta de eletroporação e mantida no gelo. No eletroporador, a cuveta foi posicionada e o pulso aplicado. Imediatamente 1 ml de meio SOC (2% p/v de tripton, 0,5% p/v de extrato de levedura, 0,058% p/v de Cloreto de sódio, 0,02% p/v

de Cloreto de potássio, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) foi então adicionado e a suspensão transferida para um tubo de microcentrífuga para ser incubado por 6 horas a 28°C. Transcorrido o tempo necessário à transformação, plaqueou-se 100 µl da suspensão de células em meio YEB contendo canamicina e gentamicina. A placa foi incubada a 28°C durante 3 dias, no qual foi possível coletar colônias isoladas. Após a seleção, análises de PCR de colônia empregando oligonucleotídeos específicos foram realizadas a fim de confirmar a transformação das agrobactérias.

3.3.2. Transformação de *Arabidopsis thaliana* empregando os cassetes construídos

Para realizar as análises funcionais dos promotores em estudo optou-se pela transformação de *A. thaliana* empregando a técnica de imersão floral (Zhang *et al.*, 2006). Para tal, sementes de *A. thaliana* selvagem (Col-0) foram previamente mergulhadas em solução de agarose 0,05% e mantidas no escuro a uma temperatura de 3 a 4°C para a quebra da dormência. Em seguida, aproximadamente 30 sementes foram colocadas para germinar em vaso contendo substrato úmido. Os vasos foram cobertos com papel filme por 24 horas, e as plantas cultivadas em câmara de crescimento.

Os clones de *A. tumefaciens* transformados com os cassetes contendo os promotores de interesse foram colocados para crescer em 500 ml de LB líquido adicionado de canamicina por período de 16 a 24 horas a 28°C, até que uma

absorbância de aproximadamente 1,5~2,0 a 600 nm fosse obtida. As células foram coletadas e centrifugadas a 4000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 1 volume de solução de sucrose usando barra de agitação. Foi adicionado surfactante (Silwet L-77) na concentração de 0,02% do volume (100 µl para 500 ml de solução bacteriana), sendo a solução misturada e transferida para um béquer de 500 ml. Em seguida, as partes aéreas contendo as flores de *A. thaliana* (plantas cultivadas em vasos individuais) foram submersas na suspensão bacteriana de *A. tumefaciens* por 30 segundos sob leve agitação. As plantas foram removidas da solução, drenadas por 5 segundos, a fim de se retirar o excesso, e cobertas com filme plástico para manter uma alta umidade. No dia seguinte, a cobertura foi removida e as plantas transformadas levadas à câmara de crescimento. Após 30 dias, as sementes foram coletadas com o auxílio de uma malha.

3.3.3. Esterilização e Seleção das sementes de *A. thaliana* transformadas

Para esterilização, as sementes (100 µg) provenientes das plantas transformadas foram embebidas por 10 minutos em solução contendo: 50% água Mili-Q, 50% água sanitária e 0,02% Triton. Em seguida foram lavadas (3x) com água Milli-Q autoclavada.

A seleção dos transformantes foi feita pós-germinação utilizando-se o tamanho do hipocótilo das plântulas como parâmetro conforme descrito por Harisson *et al.* (2006). Para tal, sementes transformadas com os promotores de interesse foram colocadas para germinar em 50 ml de meio MS (Murashige, T. Skoog, 1962) com antibiótico (higromicina B 15 µg.ml⁻¹) por um período de 2 dias no escuro a 4°C. Após esse período foram iluminadas por 4-6 h para estimular e sincronizar a germinação, e

recolocadas no escuro por 2 dias para permitir a extensão do hipocótilo. Após o período adicional de luz de 24 horas, os transformantes foram facilmente identificados através de seus hipocótilos mais alongados.

3.3.4. Extração de DNA genômico e verificação da transformação

A extração de DNA genômico das plantas transgênicas (geração T2) foi realizada usando a técnica de CTAB descrita por Doyle e Doyle (1987) com modificações. Folhas de plantas de 3 a 4 semanas crescidas em meio MS foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Cerca de 50 -100 mg de tecido foi macerado em cadinho com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e então transferido para um tubo contendo 400 µl de tampão de extração CTAB adicionado de β-mercaptoetanol. Adicionou-se a amostra 400 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após agitação manual, as fases foram separadas por centrifugação a 13200g por 3 minutos, o sobrenadante recuperado, e a ele adicionado igual volume de isopropanol gelado. Centrifugou-se por 10 minutos a 13200g a 4°C. O sedimento formado foi então incubado com RNase A (concentração final de 100 µg/ml) a 37°C por 30 minutos. O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com 1 ml de etanol 70%, seco à temperatura ambiente e suspenso em 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 ; EDTA 1 mM pH 8,0).

Para confirmar a efetiva transformação da planta, uma reação de PCR foi realizada a fim de se verificar a presença de cada cassete de expressão (e respectivo promotor). Na reação foram empregados oligos que se anelam à sequência do promotor (ActEcoRI 5'CGAATTCCGCTCATCCCGGCCGAGAA3' e LacBamHI 5'

CGCGGATCCTTGAACATAGGCATTAT 3', respectivamente) e um oligo reverso que se anela no gene repórter (GUS reverso - 5'AGAACACACGAAATAAAGTAATCAG 3')

3.3.5. Análise histoquímica da atividade GUS nas plantas contendo os promotores em estudo

O ensaio histoquímico para detecção *in situ* da atividade GUS foi realizado baseado em Jefferson *et al.* (1987). Este ensaio detectou a atividade da enzima β -glucuronidase nos órgãos/tecidos transformados utilizando um substrato halogênico (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide; X-Gluc), que uma vez processado se torna azulado.

3.4. Localização *in situ* da atividade GUS em cortes histológicos - promotor do gene *EgLac*

A localização da atividade de GUS nas plantas transformadas com o promotor *EgLac* foi também realizada em cortes histológicos de material obtido a partir de plântulas com 7 dias após germinação. Para tal, diferentes linhagens de terceira geração (T3) foram empregadas. Para a inclusão do material vegetal em resina plástica, este foi primeiramente fixado em formaldeído 4 % (preparado a partir de paraformaldeído) em tampão fosfato 0,2 M pH 7,2 por 24 h a 4°C (Karnovsky, 1965). Após a fixação, o material foi desidratado em etanol (10, 30, 50 e 70%) por 30 minutos em cada passagem, e em etanol 96% e 100% por 2 horas. Os tecidos foram

então pré-infiltrados, infiltrados e polimerizados com a resina plástica seguindo o protocolo de Gerrits (1991) e recomendações do fabricante (HistoResin, Jung, Alemanha). As amostras incluídas foram montadas em blocos de madeira e seccionadas em micrótomo rotativo, com navalha do tipo C. Os cortes com 10 µm de espessura foram analisados e fotografados em microscópio óptico Olympus BX51.

3.5. Extração do RNA total de diferentes órgãos/tecidos de *A. thaliana* transformada como promotor do gene *EgAct*.

Para a extração de RNA total de *A. thaliana* foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen) segundo protocolo descrito pelo fabricante com pequenas modificações. Plântulas das linhagens transgênicas Act. 2.3 e Act. 5.3, separadas em amostras órgão/teciduais como mostra a Tabela 02, foram inicialmente maceradas em nitrogênio líquido, separadamente. Em seguida, 1 ml de Trizol foi adicionado à cerca de 100-200 mg do tecido macerado, procedendo-se a homogeneização em agitador. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante coletado seguido da adição de 200 µl de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada em agitador, e após incubação por mais 3 minutos a temperatura ambiente, centrifugada a 12000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 500 µl de isopropanol. Após incubação por 60 minutos a -20°C e centrifugação por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o sedimento lavado com 1ml de etanol 70 %. Após uma nova centrifugação a 7500xg por 5 min a

4°C, o sedimento foi seco e ressuspenso em 30 µl de H₂O tratada com DEPC. A integridade do RNA total extraído foi determinada por eletroforese em gel desnaturante (contendo 1,85% de formaldeído) de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Tabela 02 - Amostras de diferentes órgãos/tecidos coletadas de diferentes linhagens de *A. thaliana* visando a extração do RNA total para quantificação da expressão de GUS.

Tempo Linhagens	Amostras coletadas em 5 semanas*	Amostras coletadas em 7 semanas*	Amostras coletadas em 9 semanas*
Act. 2.3	Parte aérea Raiz	Folha Caule Raiz	Folha Caule Raiz Parte reprodutiva (flor e vagem)
Act. 5.3	Parte aérea Raiz	Folha Caule Raiz	Folha Caule Raiz Parte reprodutiva (flor e vagem)

* Semanas após a germinação

3.6. Quantificação da expressão de GUS por PCR em tempo real (qPCR) em plantas transformadas com o promotor do gene *EgAct*.

Amostras de RNA total (~2 µg) tratadas com DNaseI (Fermentas) foram submetidas a transcrição reversa utilizando-se Oligo dT17VN (2 µM) e *SuperScriptTM III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), segundo as informações do fabricante. O produto da transcrição reversa foi quantificado utilizando-se o ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). As amostras de cDNA foram ajustadas para uma concentração de 70 ng/µl e então diluídas 10x para posterior utilização na reação de qPCR. A plataforma *Step One Plus* (Applied Biosystems) foi utilizada para a realização da qPCR.

Na amplificação foram usados oligonucleotídeos específicos para o gene GUS (GUS F- 5'TTGCCAACGAACCGGATAC3' e GUS R-5'GCCAGTGGCGCGAAATATT3') e para o gene normalizador GAPDH de *A. thaliana* (AT3G26650.1) (GAPDH -F 5'GCCAAGGCTGGGATTGC3' e GAPDH- R 5' GTCGTACCATGACACCAACTTCA3'), todos desenhados no programa Primer Express.

A reação de qPCR consistiu de 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, com posterior anelamento e extensão a 62°C por 1 min, o qual foi repetido por quarenta vezes. Após a reação foi adicionado um passo de dissociação através da elevação da temperatura de 60°C para 95°C, com elevação de 1°C a cada minuto. Este procedimento permitiu verificar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados ou a formação de *primers-dimers*.

A quantificação relativa foi determinada empregando-se o método de $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), A seguinte equação foi utilizada para o cálculo da expressão relativa:

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

Onde:

ER= expressão relativa

ΔCt = Ct gene alvo – Ct gene normalizador

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

3.7. Análises filogenéticas das lacases de Eucalipto

Um busca por novos genes codificadores de lacase no genoma do Eucalipto foi empreendida utilizando como iscas as sequências de *EgLac* e de diferentes lacases de arabidopsis. Uma árvore filogenética foi então construída a partir do alinhamento das sequências mineradas em eucalipto e as sequências de lacases das seguintes espécies vegetais (61 no total): *A. thaliana*, *Sorghum bicolor*, *Populus trichocarpa*, *Zea mays*, *Gossypium arboreum* (Tabela 03). A árvore foi inferida pelo método da máxima verossimilhança com base no modelo JTT matricial (Jones *et al.*, 1992). A filogenia foi testada por Bootstrap (1000 repetições). O alinhamento foi feito em T-CAFÉ (Notredame *et al.*, 2000), e as análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

Tabela 03 - Sequências do GenBank usadas para construir a Árvore Filogenética.

Nome do Gene	Número de Acesso	Nome da Espécie
AtLAC1	AEE29678	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC2	AEC08215	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC3	AEC08358	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC4	AEC09487	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC5	AEC09819	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC6	AEC10723	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC7	AEE74739	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC8	AED90291	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC9	AED90292	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC10	AAT41838	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC11	AED90578	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC12	AED90868	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC13	AED91113	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC14	AED91381	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC15	AED95619	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC16	AED97116	<i>A. Thaliana</i>
AtLAC17	AAU95426	<i>A. Thaliana</i>
SORBIDRAFT_10g030340	EER90403	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_09g022460	EES19646	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_09g022510	EES18346	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_08g011530	EES15935	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_08g000720	EES15522	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_05g026630	EES08970	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_05g025570	EES08902	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_05g022480	EES08730	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_05g000680	EES07861	<i>Sorghum bicolor</i>

Nome do Gene	Número de Acesso	Nome da Espécie
SORBIDRAFT_04g034620	EES05877	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_04g034610	EES05876	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_04g027860	EES05524	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_04g027850	EES05523	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039530	EES03867	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039520	EES03866	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g028920	EES03326	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g009410	EES02682	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039980	EES01761	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039970	EES01760	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039960	EES01759	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g039570	EES01742	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_03g038550	EES01686	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_01g039690	EER92483	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_01g038130	EER95014	<i>Sorghum bicolor</i>
SORBIDRAFT_02g000300	EER97812	<i>Sorghum bicolor</i>
PtLAC3	CAC14719	<i>Populus trichocarpa</i>
PtLAC90	CAC14720	<i>Populus trichocarpa</i>
PtLAC110	CAA74105	<i>Populus trichocarpa</i>
ZmLAC1	AAX83112	<i>Zea mays</i>
ZmLAC2	CAJ30498	<i>Zea mays</i>
ZmLAC3	CAJ30499	<i>Zea mays</i>
ZmLAC4	CAJ30500	<i>Zea mays</i>
ZmLAC5	CAJ30497	<i>Zea mays</i>
GaLAC1	AAR83118	<i>Gossypium arboreum</i>

4. Resultados e Discussão

4.1. Validação da expressão do gene *EgAct*

Como base nos resultados de expressão gênica obtidos utilizando a ferramenta “*eFP Browser (Developmental map)*” disponível no *Botanical Array Resource* (BAR), o gene *AtACT2* que codifica uma actina em *arabidopsis* apresenta uma expressão ubíqua, exceção feita ao grão de pólen (Figura 2).

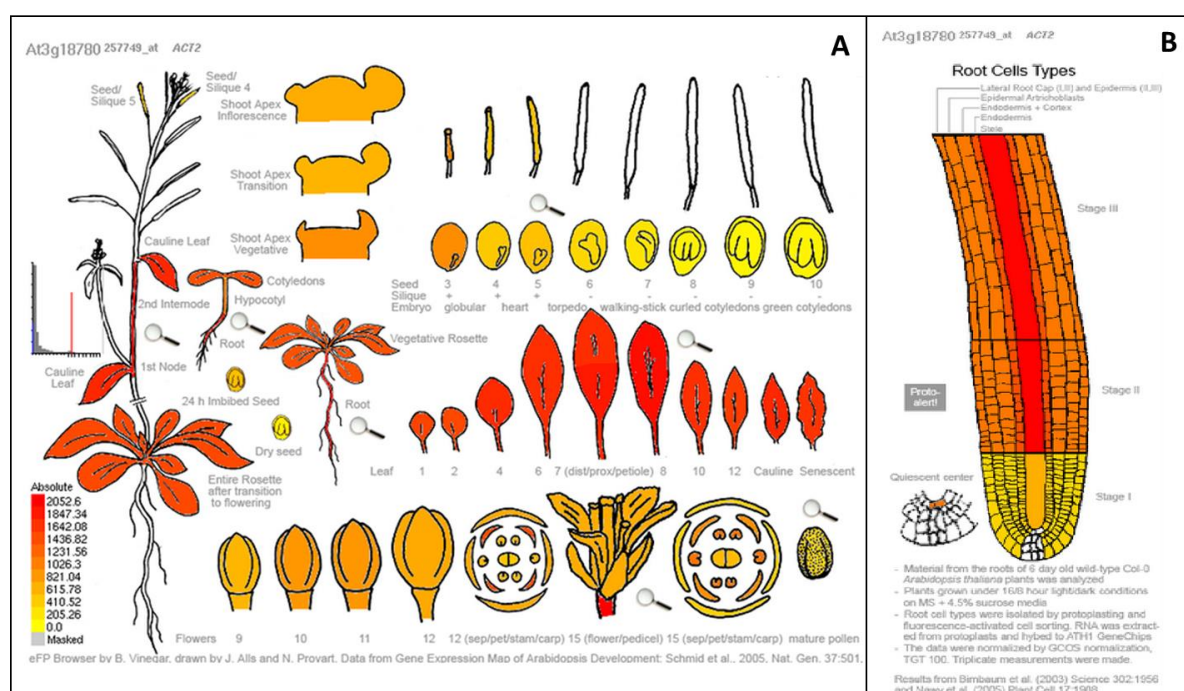


Figura 2 - Análise da expressão do gene *AtAct2* em *A. thaliana* Col-0 empregado os recursos disponibilizados no Botanical Array Resource (BAR). A- Mapa de desenvolvimento; B- Mapa da Raiz.

A sequência de *AtACT2* foi usada como isca para encontrar um EST com alta similaridade no banco de dados do genoma eucalipto (*Eucgr.l00241.1*). Oligos foram

então desenhados com base na sequência do EST selecionado para validar a expressão do gene correspondente em amostras de RNA total de folha, caule, raiz e botão floral de eucalipto. A validação realizada por qPCR revelou uma expressão ubíqua do gene alvo (Figura 3). Porém, variações na expressão deste gene nos diferentes órgãos/tecidos analisados puderam ser constatadas, sendo a acumulação de transcritos mais expressiva em folha seguida de caule e raiz. Estes resultados sugerem um padrão ubíquo de expressão, porém não constitutivo.

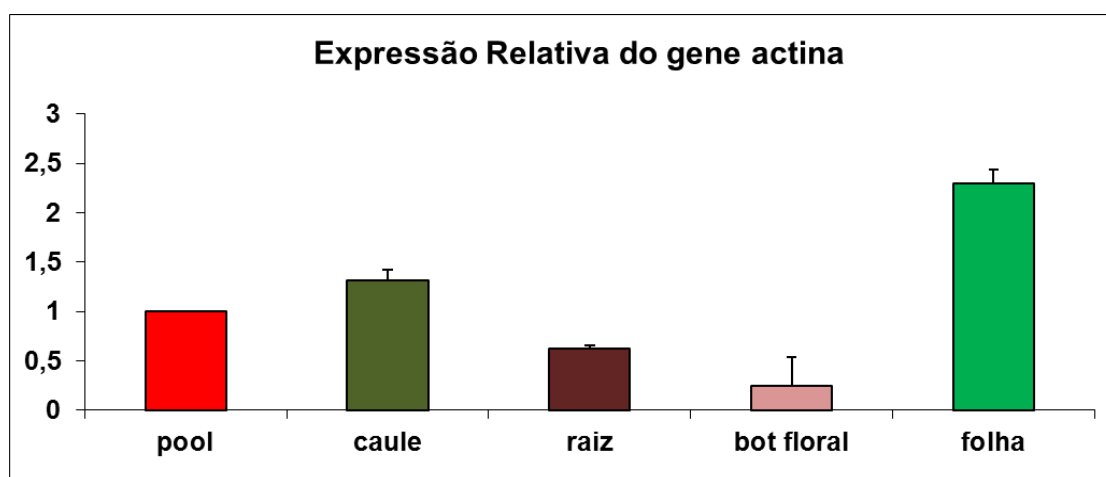


Figura 3 - Expressão relativa do gene *EgAct* em amostras extraídas de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto.

Uma vez validada a sua expressão, a região promotora do gene *EgAct* (1300 pb) foi amplificada por PCR empregando DNA genômico de eucalipto e oligos específicos como descrito no Material e Métodos. Um cassete de expressão foi então construído em pCAMBIA-1381z para posterior transformação de *A. thaliana*.

4.2. Confirmação da transformação dos cassetes de expressão em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Os cassetes de expressão contendo o gene *uidA* sob controle dos promotores *EgAct* e *EgLac*, ambos inseridos no vetor binário pCAMBIA-1381z, foram transformados em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV 3101. Após a devida seleção com antibiótico, a análise de PCR de colônia empregando os oligonucleotídeos específicos foi realizada a fim de confirmar a transformação das agrobactérias. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% como mostra a Figura 4.

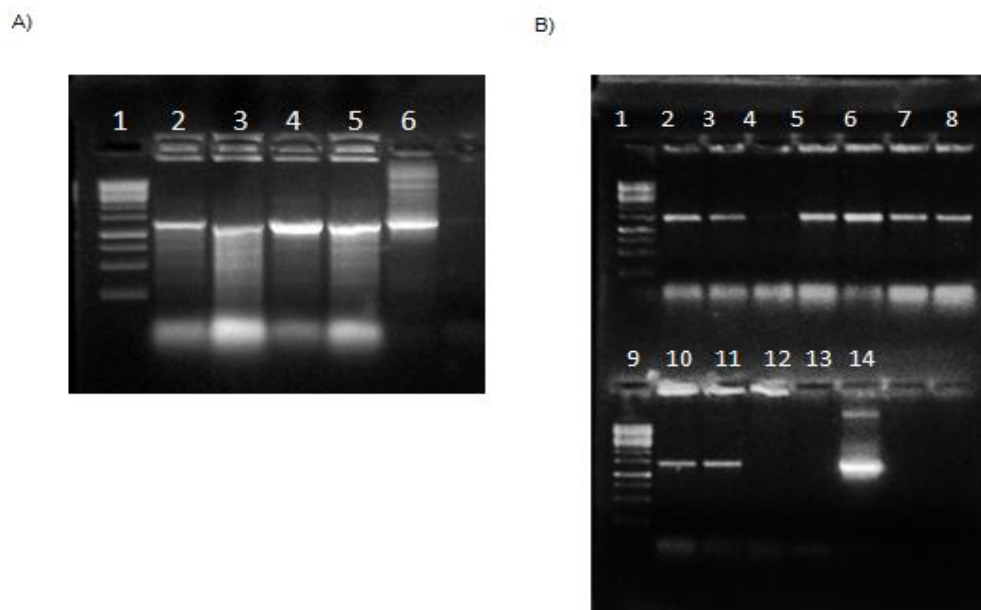


Figura 4 - Confirmação da presença dos cassetes de expressão contendo os promotores dos genes EgAct (A) e EgLac (B), respectivamente, em colônias de *A. tumefaciens* linhagem GV 3101 transformadas. A) 1- ladder 1Kb, 2, 3, 4 e 5- Produtos de PCR obtidos a partir de colônias transformadas; 6- Controle Positivo: Produto de PCR obtido a partir de Miniprep de cultura permanente de DH5 α contendo o cassete de expressão (pCambia-1381z) mais o promotor do gene EgAct B) 1- ladder 1Kb; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12- Produtos de PCR obtidos a partir de colônias transformadas; 9- ladder 1Kb; 13- Branco; 14 Controle positivo: Produto de PCR obtido a partir de Miniprep de cultura permanente de DH5 α contendo o cassete de expressão (pCambia-1381Z) mais o promotor do gene EgLac.

4.3 Confirmação da transformação de *A. thaliana* com os cassetes construídos

Os clones positivos de *A. tumefaciens* obtidos na etapa anterior foram usados para transformar *A. thaliana* visando à validação funcional dos promotores em estudo. Para confirmar a presença do cassete de expressão no material transformado, uma reação de PCR empregando DNA genômico extraído de plântulas representativas de

diferentes eventos de transformação foi realizada. A amplificação resultou em banda de tamanho esperado nas diferentes amostras analisadas (geração T1) demonstrando que a inserção foi efetiva, como mostra a Figura 5.

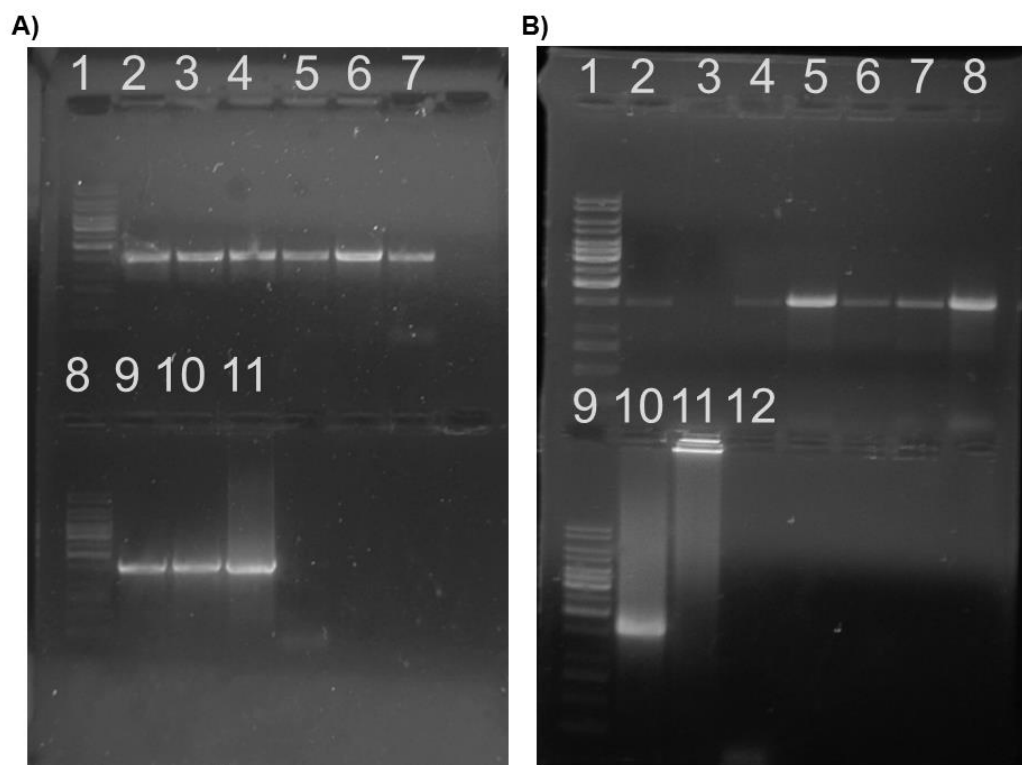


Figura 5 - PCR confirmatório da inserção em *A. thaliana* dos cassetes contendo os promotores dos genes *EgAct* e *EgLac*. A) Reação de PCR confirmando a presença do cassete do promotor *EgAct* -. 1- Ladder 1Kb; 2 - Eventos de transformação (E.T.) 2.1; 3 - E.T. 2.3; 4- E.T. 2.4; 5- E.T. 3.1; 6- E.T. 4.3; 7- E.T. 4.5; 8- Ladder 1 kb; 9- A. E.T. 5.2; 10- E.T. 5.3; 11- Controle Positivo Vetor pCambia-1381Z + Promotor *EgAct*; 12- Branco. B) Reação de PCR confirmando a presença do cassete do promotor *EgLac* - 1- Ladder 1Kb; 2- E.T. 2.1; 3- E.T. 2.2; 4- E.T. 2.4; 5- E.T. 2.5; 6- E.T. 3.4; 7- E.T. 5.1; 8- E.T. 5.2; 9- Ladder 1 kb; 10- Controle Positivo Vetor pCambia-1381Z + Promotor *EgLac*; 11- Reação teste para controle positivo; 12- Branco. Os produtos foram analisados em gel de agarose 0,7%

4.4. Análise histoquímica da atividade GUS nas plantas transformadas com os promotores em estudo

A validação do padrão de expressão dos promotores investigados foi realizada empregando ensaio histoquímico para detecção *in situ* da atividade GUS como descrito por Jefferson *et al.* (1987). Para tal, plântulas inteiras ou amostras de diferentes órgãos/tecidos de 03 eventos de transformação independentes (E.T.) de arabidopsis de geração T2 (denominados Act 2.3, Act 3.4 e Act 4.2 para o gene *EgAct*; e Lac. 2.1, Lac 2.4 e Lac 5.1 para o gene *EgLac*) foram analisadas.

No caso do promotor do gene *EgAct*, os resultados obtidos mostram que a atividade GUS foi detectada no sistema vascular de diferentes órgãos/tecidos tanto em plantas jovens como adultas (Figura 6). O padrão de expressão observado foi semelhante para todos os eventos de transformação testados.

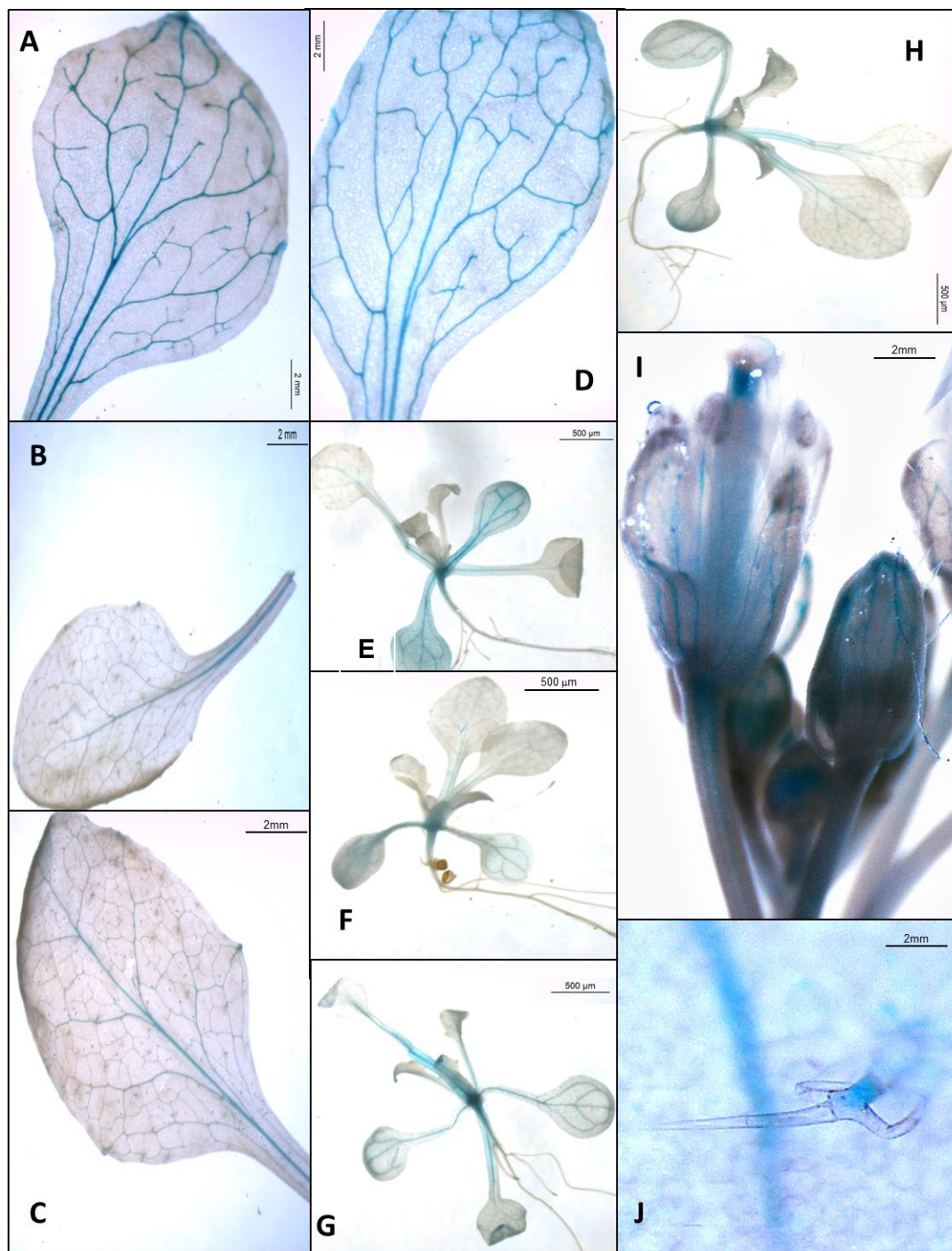


Figura 6 - Teste histoquímico da atividade GUS em plantas de arábidoopsis transformadas com promotor do gene *EgAct* (eventos de transformação independentes- E.T. de arábidoopsis de geração T2) A- Detalhe de folha de Act 2.3 com 20 dias; B- Detalhe de folha de Act 3.4 com 20 dias; C- Detalhe de folha de Act 4.2 com 20 dias; D- Detalhe de folha de Act 4.3 com 20 dias; E- Plântula Act 2.3 com 14 dias; F- Plântula Act 3.4 com 14 dias; G- Plântula Act 4.2 com 14 dias; H- Plântula Act 4.3 com 14 dias; I- Inflorescência de Act 4.2 com 45 dias; J- Tricoma foliar de Act 2.3 com 45 dias.

Trabalhos de validação de perfil de expressão de dois genes de Actina (ACT4/ACT12) em *A. thaliana* revelaram um padrão de expressão muito semelhante ao observado no presente estudo, ou seja, a expressão foi detectada nos tecidos vasculares de raízes e folhas. Além disso, um baixo nível de expressão foi observado em tecidos vasculares de inflorescência (Huang *et al.*, 1996). Como já mencionado, as análises do padrão de expressão tecido-específico e ao longo do desenvolvimento realizadas utilizando os recursos do BAR demonstraram que a expressão do gene *AtAct2* (AT3G18780), usado como isca para a identificação do EST de eucalipto, ocorre em praticamente todos os órgãos/tecidos, sendo uma expressão vascular bem evidenciada em raiz (Figura 2).

Os resultados obtidos empregando arabidopsis transformadas com o promotor do gene *EgLac* também revelaram um padrão de expressão vascular (Figura 7), o qual pode ser evidenciado em todos os eventos de transformação analisados nos testes histoquímicos. A presença de atividade GUS em tricomas e botão floral também foi observada (Figura 7- J).

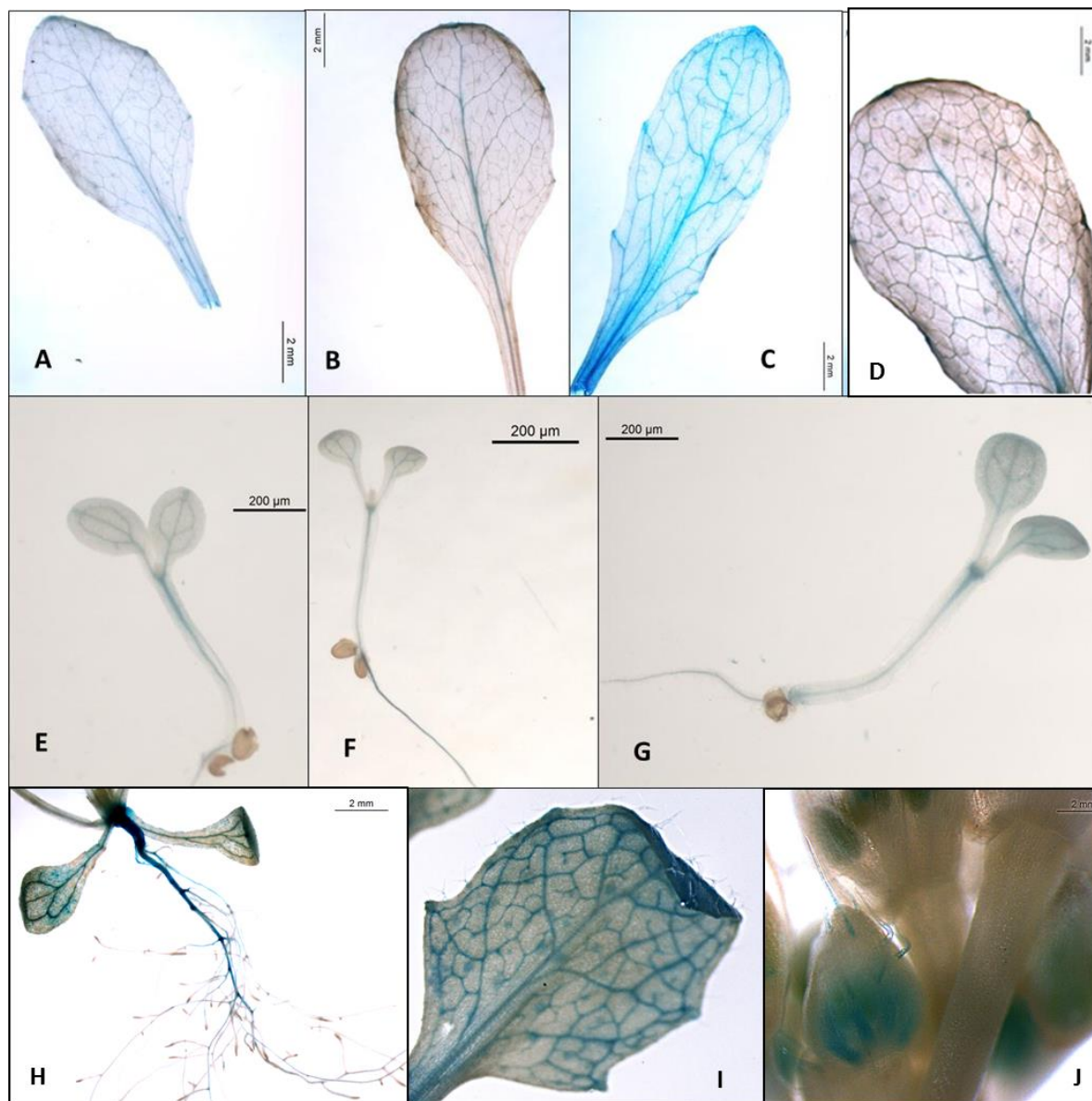


Figura 7 - Teste histoquímico da atividade GUS em plantas de arabidopsis transformadas com promotor do gene *EgLac*- (de transformação independentes - *E.T. de arabidopsis de geração T2*). A- Detalhe de folha Lac 2.1 com 20 dias; B- Detalhe de folha de Lac. 2.4 com 20 dias; C- Detalhe de folha de Lac. 5.1 com 20 dias; D- Detalhe de folha de Lac. 5.2 com 20 dias; E- Plântula de Lac 2.1 com 7 dias; F- Plântula de Lac 2.4 com 7 dias; G- Plântula de Lac 5.2 com 7 dias; H- Plântula Lac 5.2 com 14 dias; I- Detalhe da folha de Lac 2.1 com 14 dias; J- Inflorescência de Lac 5.2 com 45 dias.

O padrão de expressão do gene *EgLac* já havia sido previamente investigado em nosso laboratório, sendo que uma expressão específica em câmbio de eucalipto

havia sido revelada em ensaios de RT-PCR. A sequência deduzida de aminoácidos da proteína codificada por *EgLac* apresenta alta similaridade com a proteína codificada pelos genes *AtLAC17* e *AtLAC2*. Análises do padrão de expressão tecido-específico e ao longo do desenvolvimento destes genes de *Arabidopsis* no BAR revelaram uma expressão exacerbada no sistema vascular da raiz e do caule (Figuras 8 e 9), um padrão muito similar ao detectado para o promotor *EgLac* em *Arabidopsis*.

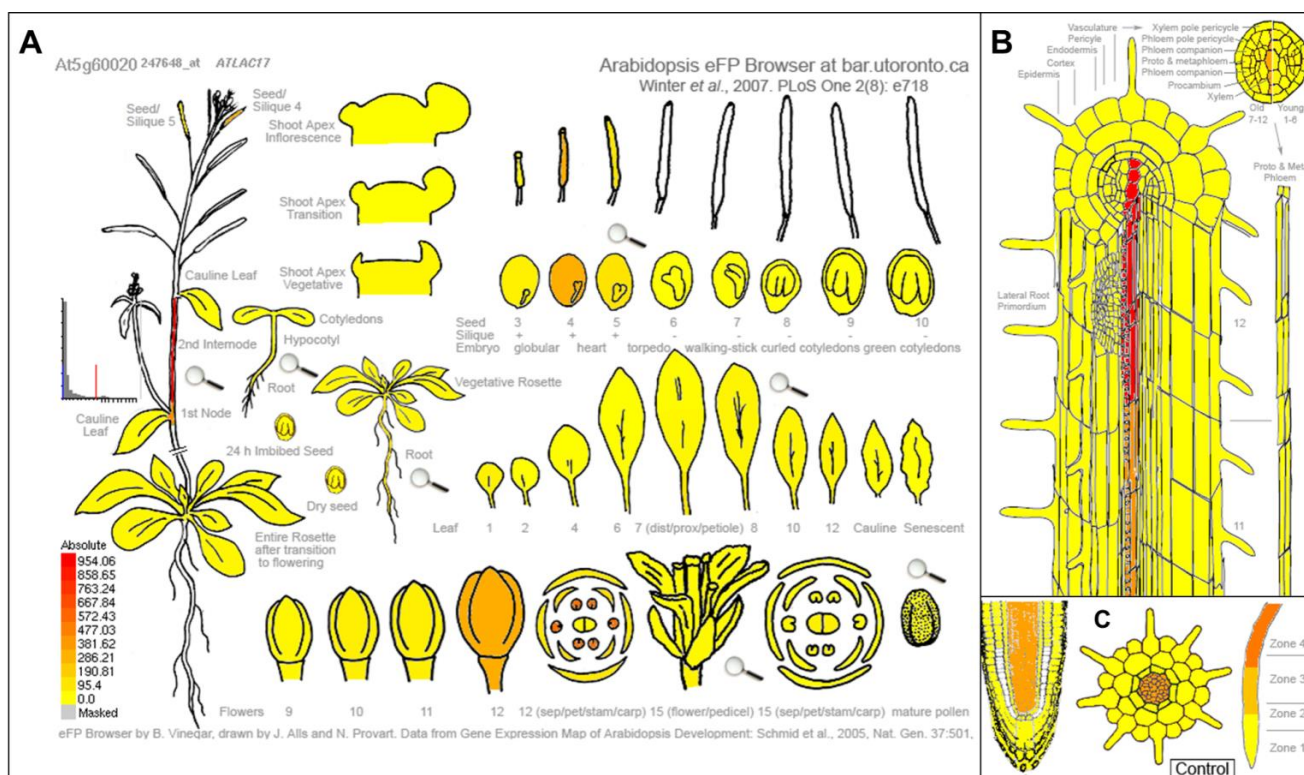


Figura 8- Padrão de expressão do gene *AtLAC17* em *A. thaliana* Col-0 obtido empregando os dados de expressão em larga escala disponibilizados no Botanical Array Resource (BAR). A - Mapa de desenvolvimento; B - Raiz com 5,6 dias de idade; C- Corte transversal de raiz na junção do hipocótilo.

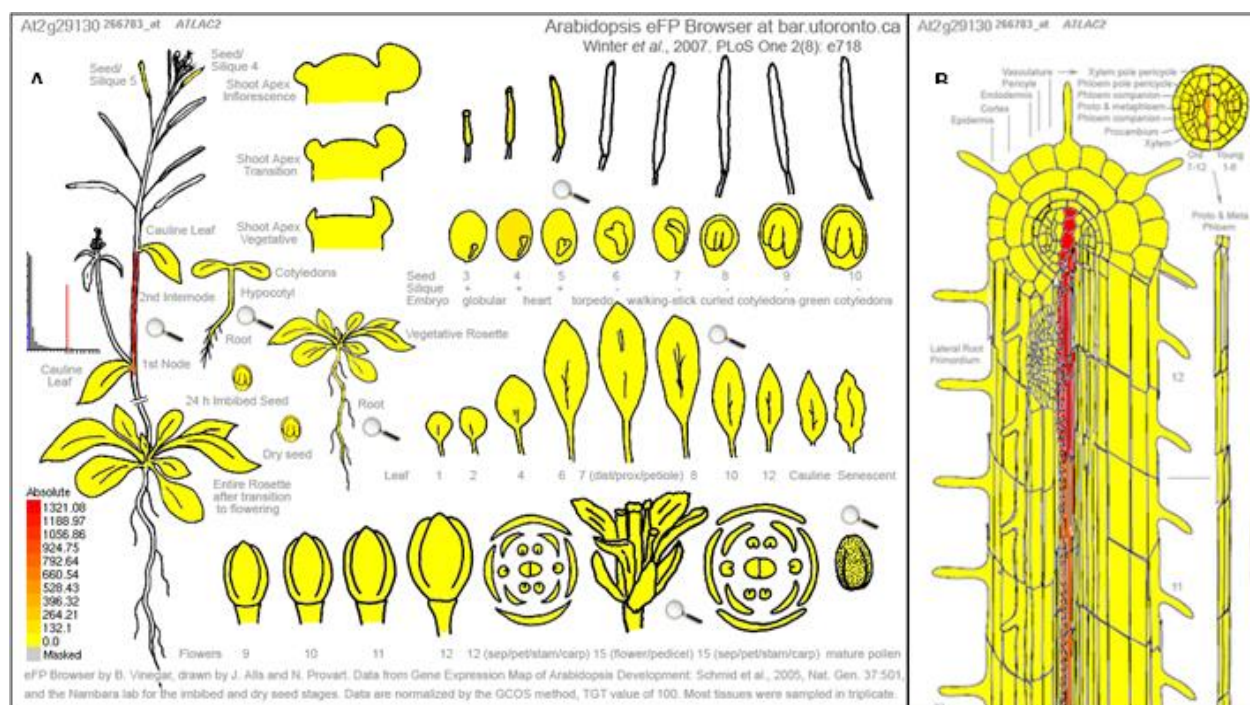


Figura 9- Padrão de expressão do gene *AtLAC2* em *A. thaliana* Col-0 obtido empregando os dados de expressão em larga escala disponibilizados no Botanical Array Resource (BAR). A- Mapa de desenvolvimento; B- Raiz com 5,6 dias de idade.

4.5. Localização in situ da atividade de GUS em plantas transformadas com promotor do gene *EgLac*

A localização tecidual da atividade GUS determinada pelo promotor do gene *EgLac* foi investigada em cortes histológicos de folha e raiz. Para tal foram empregadas plântulas transgênicas com sete dias pós-germinação submetidas aos ensaios histoquímicos. Neste caso, uma marcação específica do floema foi observada em cortes de raiz e folha (Figura 10; Painéis A e B). Em folha observa-se ainda a atividade GUS associada à cutícula, como se pode observar na Figura 10 B.

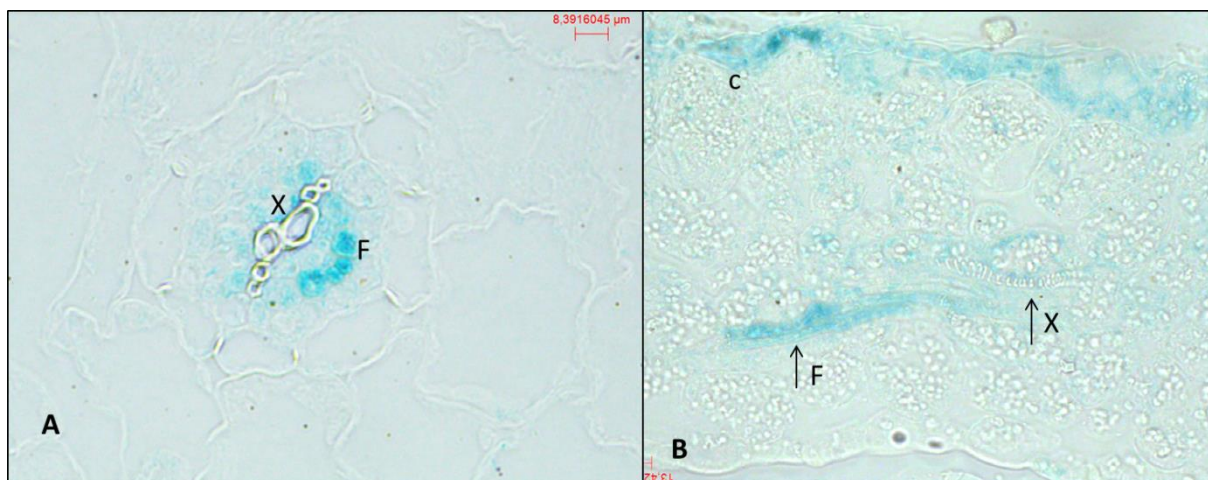


Figura 10 - Cortes histológicos de raiz e folha de plântulas de *A. thaliana* transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor do gene *EgLac*. A - Corte transversal de raiz evidenciando a atividade GUS no Floema (F). B - Corte longitudinal de folha evidenciando a marcação no floema (F) e cutícula (C). F-floema; X- xilema; c- cutícula. Fotos de um evento de transformação (T2) representativo estão sendo mostradas.

Corroborando os resultados aqui relatados, o promotor do gene *AtLAC8* também foi capaz de dirigir a expressão do gene repórter GUS exclusivamente no floema caulinar (Turlapati *et al.*, 2011). Esses autores estudaram o padrão de expressão determinado pelos promotores de 17 genes codificadores de lacase em arabidopsis, e verificaram padrões bastante variáveis. Por outro lado, o padrão de expressão tecido-específico determinado pelos promotores dos genes *AtLAC4* e *AtLAC17* evidenciou uma expressão em câmbio e nas fibras interfasciculares, respectivamente. Em arabidopsis, LAC4 e LAC17 estão implicadas em processos de lignificação como relatado por Berthet *et al.* (2011), mas o papel fisiológico de LAC8 ainda não foi desvendado.

4.6. Quantificação da expressão relativa de GUS em plantas transformadas com o promotor do gene *EgAct*.

Com o objetivo de investigar uma possível expressão constitutiva de GUS sob controle do promotor *EgAct*, ensaios de expressão relativa foram realizados utilizando as linhagens transgênicas 2.3 e 5.3 (geração T3). O perfil de expressão do gene repórter GUS foi determinado em diferentes órgãos/tecidos coletados em diferentes fases de desenvolvimento da planta (Tabela 2) sendo que um pool de tecidos foi usado como amostra de referência. É importante ressaltar que os ensaios foram realizados em triplicata, e que o normalizador utilizado foi o gene endógeno de AtGAPDH de *A. thaliana* (AT2G47400.1). Pelos resultados obtidos (Figura 11 e 12) foi possível observar que a expressão do gene repórter em ambas as linhagens (Act 2.3 e Act 5.3) se manteve ubíqua, porém variações nos níveis de transcritos do gene entre órgãos/tecidos e entre fases de desenvolvimento dos mesmos puderam ser constatadas.

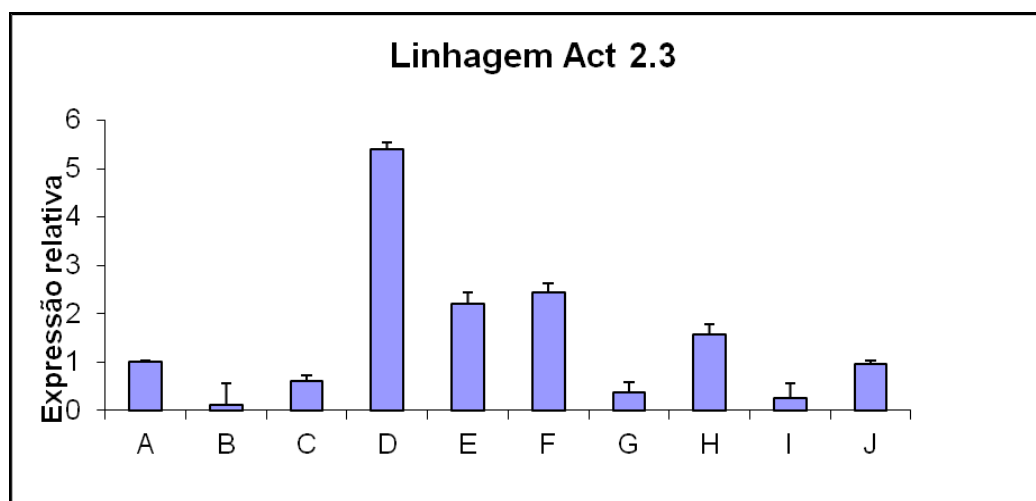


Figura 11- Expressão relativa do gene Gus sob o controle do promotor *EgAct* em plantas de *A.thaliana* Linhagem Act 2.3 (T3). A) Pool de tecidos; B) Parte aérea -folha e caule com 5 semanas; C) Folha com 7 semanas; D) Folha com 9 semanas; E) Caule com 7 semanas; F) Caule com 9 semanas; G) Raiz com 5 semanas; H) Raiz com 7 semanas; I) Raiz com 9 semanas; J) Parte Reprodutiva- flor e sílica com 9 semanas.

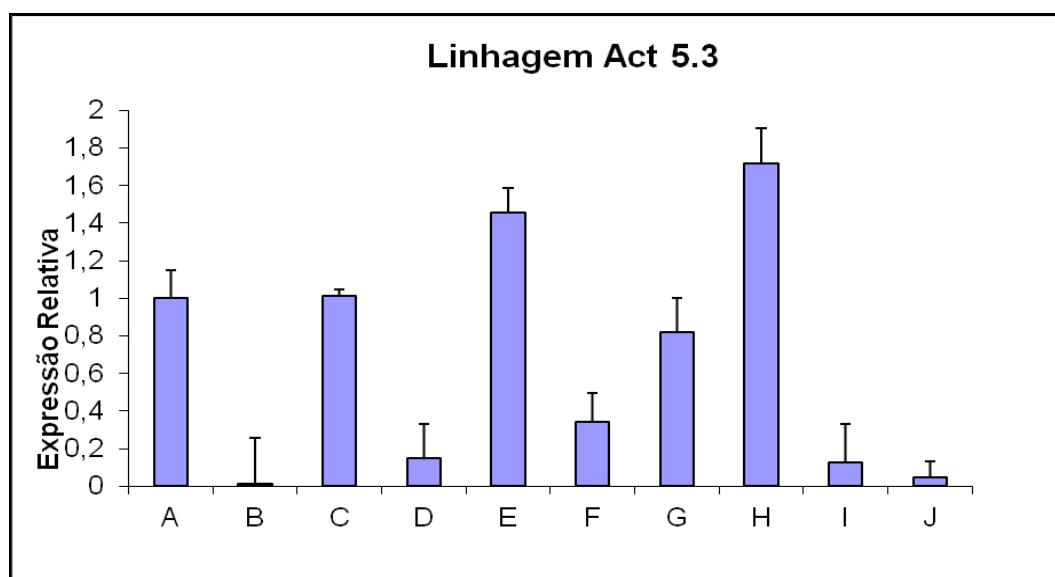


Figura 12- Expressão relativa do gene Gus sob o controle do promotor *EgAct* em plantas de *A. thaliana* Linhagem Act 5.3 (T3). A) Pool de tecidos; B) Parte aérea -folha e caule com 5 semanas; C) Folha com 7 semanas; D) Folha com 9 semanas ;E) Caule com 7 semanas; F) Caule com 9 semanas; G) Raiz com 5 semanas; H) Raiz com 7 semanas; I) Raiz com 9 semanas; J) Parte Reprodutiva- flor e sílica com 9 semanas.

4.7. As lacases em Eucalipto e suas relações filogenéticas.

Um levantamento junto ao banco EucalyptusDB revelou a presença de pelo menos dez genes codificadores de lacase no genoma de eucalipto. Neste conjunto (sequências Eucgr; Figura 13), a lacase codificada pelo gene *EgLac* (promotor em estudo) foi denominada Eucgr.B02316. A árvore filogenética resultante da comparação das lacases de eucalipto com as de outras espécies vegetais revelou a formação de 6 diferentes subgrupos (Figura 13). Essa distribuição é compatível com estudos filogenéticos prévios empregando lacases de mono e dicotiledôneas (McCaig *et al.*, 2005; Cesarino *et al.*, 2013). Os membros da família gênica das lacases de Eucalipto encontram-se dispersos ao longo da árvore estando presentes em todos os subgrupos, exceção feita ao subgrupo três que contém exclusivamente a lacases AtLAC1 e PtLAC1, consideradas divergentes. Esse padrão reflete, ao menos em parte, uma homologia de sequência relativamente baixa. O subgrupo 1, que inclui a lacase codificada pelo gene *EgLac* (Eucgr.B023161), apresenta um aglomerado de lacases monofiléticas de sorgo juntamente com as lacases AtLAC2 e AtLAC17 de arabidopsis (Figura 13). A proximidade de *EgLac* com AtLAC2 e AtLAC17 reflete uma possível relação funcional entre elas. Cabe ressaltar que AtLAC17 está relacionada com a deposição de unidades G nas fibras do caule de arabidopsis.

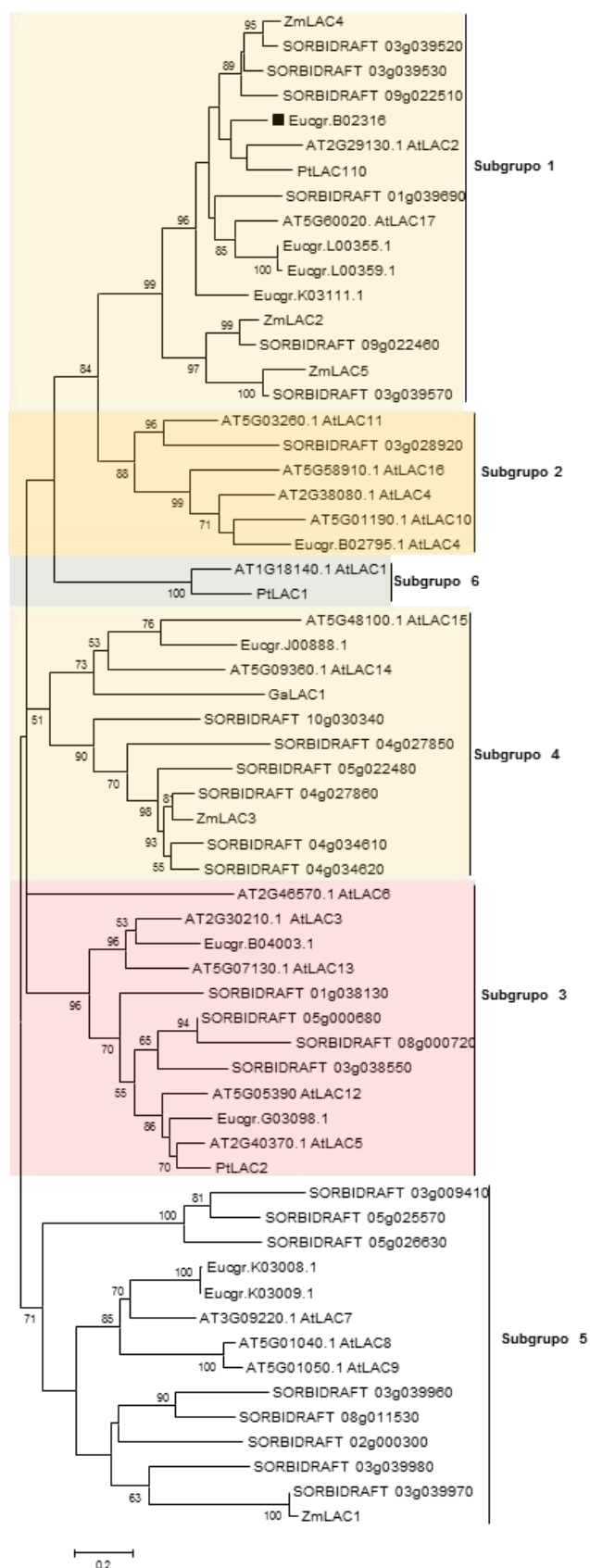


Figura 13 - Árvore filogenética gerada empregando as lacases de *E. grandis*, *A. thaliana*, *Sorghum bicolor* (sequências SORBIDRAFT), *Zea mays*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium arboreum*. A árvore foi inferida pelo método da máxima verossimilhança com base no modelo JTT matricial (Jones et al., 1992). Um total de 1000 repetições de Bootstrap foi usado, e somente valores acima de 50% são mostrados ao lado dos ramos. A EgLac (Eucgr.B02316) está sinalizada por um quadrado preto.

4.8. Análise dos elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor do gene *EgLac*

A fim de vislumbrar possíveis funções e mecanismos de regulação do gene *EgLac* , uma análise dos elementos *cis*-regulatórios presentes em sua região promotora foi realizada. Neste caso, diversos elementos putativos descritos como estando envolvidos na resposta a estresse biótico e abiótico bem como de resposta a ação hormonal foram identificados (Tabela 04).

Tabela 04 -. Distribuição dos principais elementos *cis*-regulatórios presentes no promotor do gene *EgLac* isolado de eucalipto (banco de dados PlantCARE).

Cis-elemento	Sequência	Posição (Fita DNA)*	Função
DRE	TACCGACAT	- 709 (+)	Relacionado à resposta aos estresses salino e hídrico
ABRE	TACGTGTC	-141 (-)	Elemento de resposta a ácido abscísico
CAT-Box	AGTGGC	- 1157 (-)	Relacionado com a expressão em meristema
EIRE	TTCGACC	- 497 (+)	Elemento responsivo a elicitores
GARE-motif	TAACAAA	- 178 (+)	Elemento de resposta a giberilina
		- 326 (-)	
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	- 1252 (+)	Elemento relacionado à defesa e resposta a estresses
TGA-element	AACGAC	- 683 (-)	Resposta a Metil-jasmonato
		- 938 (+)	
		- 1131 (-)	
		- 1139 (+)	

* Numeração a partir do ATG iniciador

A presença de elementos regulatórios potencialmente envolvidos com a resposta das plantas a estresses é indicativa de uma possível participação do gene *EgLac* em processos relacionados a adaptação e tolerância. A modulação da expressão de alguns genes codificadores de lacases em resposta a estresses abióticos já foi relatada na literatura. Em raízes de milho e tomate, por exemplo, uma expressão aumentada de

dois genes LAC em resposta ao estresse salino foi descrita (Wei *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2006). Por outro lado, mutantes de inserção para o gene *AtLAC2* apresentaram um comprometimento do alongamento das raízes quando submetidas ao estresse com PEG (Cai *et al.*, 2006). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que ao menos 12 dos 17 genes presentes no genoma de *Arabidopsis* são responsivos a NaCl, sugerindo um possível papel das lacases na tolerância ao estresse salino.

5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- Em *arabidopsis*, o promotor do gene que codifica uma Lacase de eucalipto (*EgLac*) apresentou atividade vascular, sendo esta restrita ao floema.
- A existência de elementos regulatórios na região promotora de *EgLac* relacionados com resposta a estresses abióticos foi observada.
- O gene *EgAct* apresentou expressão ubíqua, mas não constitutiva, em eucalipto, sendo sua expressão mais proeminente em folha seguida de caule e raiz.
- Em *arabidopsis*, o promotor do gene *EgAct* apresentou expressão preferencialmente vascular tanto em tecidos vegetativos como reprodutivos. A expressão dirigida pelo referido promotor foi ubíqua, mas a acumulação de transcritos do gene repórter foi variável entre os órgãos/tecidos analisados.

- O eucalipto apresenta pelo menos dez genes codificadores de lacase em seu genoma.

6. Perspectivas

Os dados obtidos usando o promotor do gene *EgLac* indicam que sua expressão é restrita ao floema. Como esse tecido é responsável pelo transporte e distribuição tanto de nutrientes como de outros elementos envolvidos no desenvolvimento vegetal e na síntese e acúmulo de lignina, não se pode excluir a hipótese do envolvimento desta lacase no processo de lignificação vegetal. Análises mais acuradas devem ser realizadas para estabelecer o seu papel definitivo. Nesse contexto, a presença no promotor *EgLac* de elementos regulatórios envolvidos na resposta aos estresses abióticos sugere uma possível participação em processos relacionados a adaptação e tolerância vegetal.

A presença de vários genes codificando lacases no genoma de eucalipto é bastante interessante e sugere a existência de uma possível especialização. As diferentes funções ou redundância funcional dessas diferentes lacases merece ser investigada.

7. Referências bibliográficas

Abdel-Ghany, S.E.; Pilon, M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *The journal of biological chemistry*, v.283, n.23, p. 15932–15945, 2008.

Associação Brasileira de Celulose e Papel. Dados do Setor –Dezembro de 2012. Ano de base 2011. BRACELPA. 29p. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>. Acesso em: 03/02/12

Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. 2011. Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2010 / ABRAF. Brasília. 130p. Disponível em: <http://http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF11/ABRAF11-BR.pdf>>. Acesso em: 04/02/13.

Andrade, E.N., O Eucalipto. 2ª Edição. São Paulo: Companhia Paulista das Estradas de Ferro. p. 166, 1961.

Baghdady, A.; Blervacq, A.S.; Jouanin, L.; Grima-Pettenati, J.; Sivadon, P.; Hawkins, S. *Eucalyptus gunnii* CCR and CAD2 promoters are active in lignifying cells during primary and secondary xylem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* V. 44, p.674–683, 2006

Bao, W.; O'Malley, D.M.; Whetten, R.; Sederoff, R.R. A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem. *Science* V. 260, n.5108, p. 672-674, 1993.

Bartels, J R. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Current opinion in cell biology*, V. 12, p. 72-78, 2000.

Berthet, S.; Demont-Caulet N, Pollet, B.; Bidzinski P.; Cézard, L.; Le Bris, P.; Borrega, N.; Hervé, J.; Blondet, E.; Balzergue, S.; Lapierre, C.; Jouanin, L. Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell*. V. 23, n. 3, p;1124-1137, 2011.

Boudet, A-L.; Pichon, M.; Grima-Pettenati, J.; Beckert, M.; Gamas, P.; Briat, J-F.; inventors. Centre National de la Recherche Scientifique.; Institut National de la Recherche Agronomique.; Original Assignees. DNA sequences coding for a

cinnamoyl CoA reductase and their uses in the field of regulating the lignin levels of plants. US6734332. 2002.

Brasileiro, A.C.M.; Carneiro, V.T.C.; Manual de transformação genética de plantas: Transferência de vetores para *Agrobacterium*. Brasília. 1998.

Buhtz, A.; Springer, F.; Chappell, L.; Baulcombe, D.C.; Kehr, J. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*. *Plant Journal*, V. 53, p.739-749, 2008.

Buhtz, A.; Pieritz, J.; Springer, F.; Kehr, J. Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biology*, p.10-64, 2010.

Cai, X.; Davis, E.J.; Ballif, J.; Liang, M.; Bushman, E.; Haroldsen, V.; Torabinejad, J.; Wu, Y. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. v. 57, n. 11, p. 2563-2569, 2006.

Cammue, B. P. A.; Butaye, K. M. J.; Delaure, S. L.; De Bolle, M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding*. v.16, n.1, p. 79-91, 2005.

Cesarino, I.; Araújo, P.; Sampaio Mayer, J.L.; Vicentini, R.; Berthet, S.; Demedts, B.; Vanholme, B.; Boerjan, W.; Mazzafera, P. Expression of SofLAC, a new laccase in sugarcane, restores lignin content but not S:G ratio of *Arabidopsis* lac17 mutant. *J Exp Bot*. v. 64, n. 6, p.1769-1781, 2013.

Chabannes, M.; Barakate, A.; Lapierre, C.; Marita, J. M.; Ralph, J.; Pean, M.; Danoun, S.; Halpin, C.; Grima-Pettenati, J.; Boudet, A. M. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal* . v. 28, n. 3, p. 257-270, 2001.

Chang S.; Puryear J.; Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol*. v. 11, p.113-116, 1993.

Creux N. M.; Ranik M.; Berger D. K.; Myburg A. A. Comparative analysis of orthologous cellulose synthase promoters from *Arabidopsis*, *Populus* and

Eucalyptus: evidence of conserved regulatory elements in angiosperms. New Phytologist. V. 179, p. 722–737, 2008.

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

Ferreira, E.M.; Grattaplagia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética: Extração de DNA genômico total de plantas. Embrapa, v. 3, p.121-139, 1998.

Ferreira, M.; Santos, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos Eucalyptus no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypt. Colombo: Embrapa-CNPf, p.14-34. 1997.

Fukuda, H. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. v. 47, p. 299-325, 1996.

Galuszka, P.; Frébortová, J.; Luhová, L.; Bilyeu, K.D.; English, J.T.; Frébort, I. Tissue Localization of Cytokinin Dehydrogenase in Maize: Possible Involvement of Quinone Species Generated from Plant Phenolics by Other Enzymatic Systems in the Catalytic Reaction. Plant Cell Physiol. v.46, n.5, p.716–728, 2005.

Gianfreda L.; Xu F.; Bollag J-M. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediat J., v.3, n.1, p.1-26.1999.

Glasser, W.G.; Rials, T.G.; Kelley, S.S.; Ward, T.C. Engineered lignin-containing materials with multiphase morphology. Proceedings of Internatl. Symp. Wood & Pulping Chemistry. 1989.

Harrison, S.J.; Mott, E.K.; Parsley, K.; Aspinall, S.; Gray J.C.; Cottage, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. Plant Methods. v.2, n.19, 2006.

Harakava, R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. Genetics and Molecular Biology. v. 3, n. 28, p. 601-607, 2005.

He, C.; Lin, Z.; McElroy, D.; Wu, R. Identification of a rice actin2 gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnol J.* v.7, n.3, p. 227-239, 2009.

Hightower, R. C., Meagher, R. B. The molecular evolution of actins using closely linked transposons. Active insertion of actin. *Genetics* v. 114, p. 315–332, 1986.

Huang, S.; An, Y-Q.; McDowell, J.M.; McKinney, C.; Meagher, R.B. The *Arabidopsis thaliana* ACT4/ACT12 actin gene subclass is strongly expressed throughout pollen development. *The Plant Journal*. V. 10, n.2, p. 189-202, 1996.

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, n. 13, p.3901-3907, 1987.

Jones, D.T.; Taylor, W.R.; Thornton, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*. v. 8, p. 275-282, 1992.

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. 16, n.103, p.109-20. 2002.

Kovalchuk, N.; Li, M.; Wittek, F.; Reid, N.; Singh, R.; Shirley, N.; Ismagul A.; Eliby, S.; Johnson, A.; Milligan, A.S.; Hrmova, M.; Langridge, P.; Lopato, S. Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains . *Plant Biotechnology Journal*. v. 8, n.1, p. 47–64, 2010

Lacombe, E.; Van Doorsselaere, J.; Boerjan, W.; Boudet, A. M.; Grima-Pettenati, J.; Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J.* v. 23, n.5, p.663-76, 2000.

Lauvergeat, V.; Rech, P.; Jauneau, A.; Guez, C.; Coutos-Thevenot, P.; Grima-Pettenat, 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.

Liang, M.; Haroldsen, V.; Cai, X.; Wu, Y. Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. *Plant Cell Environ.* v. 29, n. 5, p.746-53, 2006.

McKinney, E. C.; Meagher, R. B. Members of the Arabidopsis Actin Gene Family Are Widely Dispersed in the Genome. *Genetics*. V. 149, n. 2, p. 663-75, 1998.

Meagher, R.B. Divergence and differential expression of actin gene families in higher plants. *Int Rev Cytol.* V. 125, p. 139-163, 1991.

Meagher, R. B., and R. E. Williamson. *The Plant Cytoskeleton*. Editado por E. Meyerowitz, C. Somerville. Cold Spring Harbor, pp. 1049–1084, 1994.

Morais, S.A.L., Nascimento, E.R., Piló-Veloso, D. Studies of *Eucalyptus grandis* lignin and Polyphenols content in *Eucalyptus grandis* by infrared spectroscopy. *J Bot Chem Soc*, v.2, p.129-131, 1991

Lewis, N. G.; Sarkanen, S. *Lignin and Lignan Biosynthesis*. Copyright. American Chemical Society. 1998.

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

Notredame, C.; Higgins, D.G.; Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* v. 302, p. 205-217, 2000.

Novaes, E.; Kirst, M., Chiang, V., Winter-Sederoff, H., Sederoff, R. Lignin and Biomass: A Negative Correlation for Wood Formation and Lignin Content in Trees. *Plant Physiology*. v. 154, n. 2, p. 555-561, 2010.

Paiva, J.A. P.; Prat, E.; Vautrin, S.; Santos, M. D.; San-Clemente, H.; Brommonschenkel, S.; Fonseca, P.G.S.; Grattapaglia, D.; Song, X.; Ammiraju, J.S.S.; Kudrna, D.; Wing, R.A.; Freitas, A.T.; Bergès, H.; Grima-Pettenati, J. Advancing *Eucalyptus* genomics: identification and sequencing of lignin biosynthesis

genes from deep-coverage BAC libraries. BMC Genomics. v. 137, n. 12, p.1471-2164, 2011.

Paludzyszy, Filho, E.; Santos, P. E. T. Programa de Melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas: resultados e perspectivas- Dados eletrônicos: Embrapa Florestas, 2011. Disponível em <<http://www.cnpf.embrapa.br/publica/seriedoc/edicoes/Doc214.pdf>>. Acesso em 04/03/13.

Peremarti, A.; Twyman, R.M; Gómez-Galera, S.; Naqvi, S.; Farré, G.; Sabalza, M.; Miralpeix, B.; Dashevskaya, S.; Yuan, D.; Ramessar, K.; Christou, P.; Zhu, C.; Bassie, L.; Capell T. Promoter diversity in multigene transformation. Plant Mol Biol v. 73, p. 363–378, 2010.

Phillips, J.; Puthigae, S.; Yao, J.; Flinn, B.; Forster, R.S.; Eagleton, C.; Inventors. Arborgen, LLC., Original Assignees. Vascular-preferred promoters. United States Patent Application 20040163146. 2004.

Potenza, C; Aleman, L; Sengupta-Gopalan, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. In Vitro

Cell Dev Biol Plant v. 40, p.1–22, 2004.

Pryor, L.D. - The biology of eucalypts. London, Edward Arnold, p.82, 1976.

Ranocha, P.; McDougall, G.; Hawkins, S.; Sterjiades, R.; Borderies, G.; Stewart, D.; Cabanes-Macheteau, M.; Boudet, A.M.; Goffner, D. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. European Journal of Biochemistry, v. 259, n.1-2, p. 485-495,1999.

Ranocha, P.; Chabannes, M.; Chamayou, S.; Danoun, S.; Jauneau, A.; Boudet, A.-M.; Goffner, D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. Plant Physiol. v. 129, p. 145–155, 2002.

Rahantamalala, A.; Rech, P.; Martinez, Y.; Chaubet-Gigot, N.; Grima-Pettenati, J.; Pacquit, V. Coordinated transcriptional regulation of two key genes in the lignin branch pathway - CAD and CCR - is mediated through MYB- binding sites. *BMC Plant Biology*. V. 10, p.130-138, 2010.

Rengel, D.; Clemente, H.S.; Servant, F.; Ladouce, N.; Paux, E.; Wincker, P.; Couloux, A.; Sivadon, P.; Grima-Pettenati, J. A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology*. v. 29, p. 9-36, 2009.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3^a Edição. New York: Cold Spring Harbor. 1989. 2344 p.

Sanders, P.R.; Winter, J.A.; Barnason, A. R.; Rogers, S.G.; Fraley, R. T. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Research*. v. 15, p.1543-1558, 1987.

Sarkanen, K.V.; Ludwig, C.H. *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*. John Wiley and Sons, 1971

Spangenberg, G. C.; Lidgett, A. J.; Heath, R.L.; McInnes, R.L.; Lynch, D. P.; Inventors. Dairy Australia Limited, Molecular Plant Breeding Nominees Ltd. Original Assignees. *Modification of Lignin Biosynthesis*. 2008

Seagull, R.W. The plant cytoskeleton. *Crit. Rev. Plant Sci*. V.8, p. 131-167, 1989.

Singer, S.D.; Cox, K.D.; Liu, Z. Enhancer–promoter interference and its prevention in transgenic plants. *Plant Cell Rep*. v. 30, n. 5, p. 723-31. 2011.

Singh, B.K. Transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. *Plant Physiology*, V. 118, p.1111-1120, 1998.

Šlajcheroová, K.; Fišerová, J.; Fischer, L.; Schwarzerová, K. Multiple actin isotypes in plants: diverse genes for diverse roles? *Frontiers in Plant Science*. v. 3, n. 226, 2012.

Smith, J.E.; Anderson, J.G.; Senior, E.K. Bioprocessing of lignocelluloses. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. v. 321, p. 501-521, 1987

Solomon, El.; Sundaram, U.M.; Machonkin, T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Ver.* v.96, n. 7, p.2563–605, 1996.

Sterjiades, R.; Ranocha, Ph.; Boudet, A-M.; Goffner, D. Identification of specific laccase isoforms capable of polymerizing monolignols by an 'in-gel' procedure. *Analytical Biochem.* v. 242, p.158-161, 1996.

Sunilkumar, G.; Mohr, L.; Lopata-Finch, E.; Emani, C.; Rathore, K. S. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 3, p.463-474, 2002.

Vicentini, R.; Sasaki, F. T.; Gimenes, M. A.; Maia, I. G.; Menossi, M. *In silico* evaluation of the *Eucalyptus* transcriptome. *Genet. Mol. Biol.* v.28, n.3, p.487-495, 2005.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* v. 28, p. 2731-2739, 2011.

Tyagi, A.K. Plant genes and their expression. *Current Science.* v. 80, p. 161-169, 2001.

Twyman, R.M. Growth and development: control of gene expression, regulation of transcription. In: Thomas B, Murphy DJ, Murray B (eds) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*.

Elsevier Science, London, p. 558–567, 2003.

Turlapati, P.V.; Kim, K.W.; Davin, L.B.; Lewis, N.G. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta.* v. 233, n. 3, p.439-70, 2011.

Wei, J.Z.; Tirajoh, A.; Effendy, J.; Plant, A.L. Characterization of salt-induced changes in gene expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and the role played by abscisic acid. *Plant Science.* v. 159, n.1, p. 135-148, 2000.

Weilgel, D.; Glazebrook, J. *Arabidopsis: a laboratory manual*. 1^a Edição. Editora Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2002.

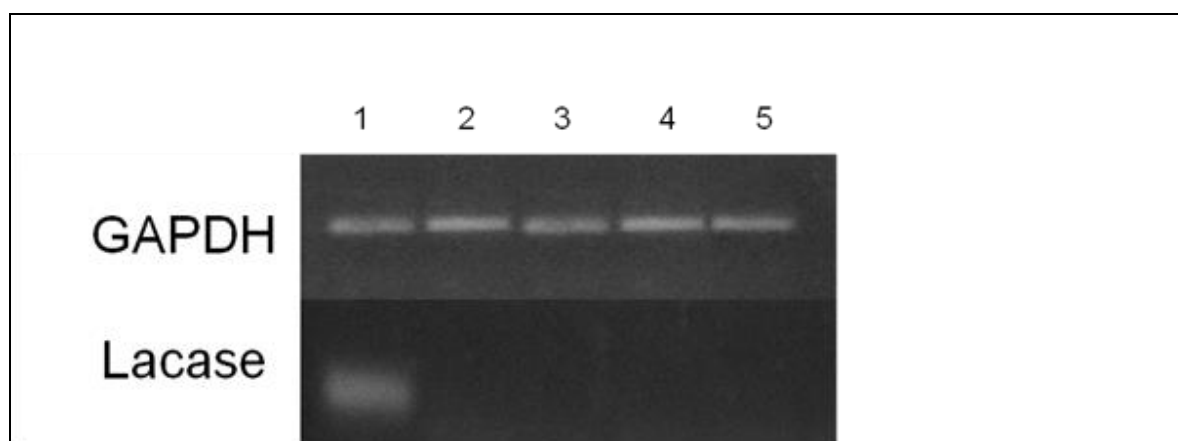
Yong-Qiang An., Huang, S., McDowell, J. M., McKinney, E. C., Meagher, R. B. Conserved Expression of the Arabidopsis ACTT and ACT3 Actin Subclass in Organ Primordia and Mature Pollen. *The Plant Cell*, V. 8, p. 15-30, 1996.

Yoshida, H. Chemistry of lacquer (urushi). *J. Chem. Soc.* v. 43, p. 472–486, 1883.

Zavallo, D.; Bilbao, M. L.; Hopp, H. E.; Heinz, R. Isolation and functional characterization of two novel seed-specific promoters from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Rep.*, v. 29, p.239-248, 2010.

Zhang, X.; Henriques, R.; Llin, S.S.; Niu, Q-W.; Chua, N.H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, v.1, n.2, p.1-6, 2006.

8. Anexos



Anexo 1 –Validação da expressão órgão/tecido-específica do gene *EgLac* . 1- Caule; 2- Raiz de plântulas com 2 meses; 3- Folha de plântulas com 2 meses; 4- Botão floral, 5- Folha de plantas com 2,7 anos. O gene *EgGAPDH* foi usado como controle ubíquo de amplificação. Neste caso, a expressão de *EgLac* foi observada exclusivamente em amostras de caule.

