

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CÍNTIA LEITE RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM PROMOTOR
RAIZ-ESPECÍFICO DE EUCALIPTO**

Orientador: Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado no
Instituto de Biociências,
Universidade Estadual “Júlio
de Mesquita Filho” Campus
de Botucatu, para obtenção
do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

BOTUCATU – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Ribeiro, Cíntia Leite.

Caracterização molecular de um promotor raiz-específico de eucalipto /
Cíntia Leite Ribeiro. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Ivan de Godoy Maia

1. Eucalipto - Melhoramento genético 2. Genética vegetal

Palavras-chave: Expressão Gênica; Eucalyptus; Promotores; Tecido-específi-
cidade

Dedico aos meus pais
José Ribeiro e Maruska e
ao meu irmão Tales.

Agradecimentos

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente. Pela sua presença constante na minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, pela educação base para minha vida, pelo amor incondicional, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

Ao meu irmão Tales, pelo amor, afeto e companheirismo.

Ao meu namorado, Murillo, pelo apoio e dedicação em todos os momentos, em especial nesta conquista.

Agradeço a Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia pela orientação, pelo apoio, e principalmente por ouvir e respeitar minhas sugestões.

À todos os funcionários, estudantes e professores do Departamento de Genética que de uma maneira ou outra contribuíram para este trabalho.

À todos da XLI Turma de Ciências Biológicas da UNESP pela companhia e amizade ao longo desses cinco anos juntos cheios de novidades e desafios para todos nós.

Finalmente, agradeço à FAPESP pela bolsa concedida.

*“O rio somente alcança os seus objetivos porque
aprendeu a superar os seus obstáculos.”*

Lenira Poli

Lista de figuras

	Pg.
Figura 01 – Validação do candidato por RT-PCR.....	20
Figura 02 – Expressão relativa do candidato em diferentes órgãos, de diferentes idades, de E. Grandis.....	21
Figura 03 – Representação esquemática da metodologia do <i>genome walking</i>	22
Figura 04 – Representação esquemática do plasmídeo pCAMBIA-1381z (Cambia) utilizado na construção dos cassetes de expressão para agroinfiltração e transformação estável de tabaco empregando <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
Figura 05 – Produtos de amplificação obtidos para o candidato específico de raiz (RT3) após o PCR secundário do <i>genome walking</i>	32
Figura 06 – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento 5B com a sequência do EST validado disponível no banco FORESTs.....	33
Figura 07 – Confirmação do posicionamento do fragmento amplificado em relação ao EST selecionado no banco FORESTs.....	34
Figura 08 – Representação esquemática do cassete de expressão contendo o fragmento 5B em fusão transcricional com o gene <i>uidA</i> (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z.....	35
Figura 09 – Amplificação do fragmento 5B com os oligos contendo os sítios para as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I.....	36
Figura 10 – Verificação da inserção do fragmento 5B no vetor pCambia-1381z por digestão com as enzimas <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I.....	37

Figura 11 - PCR confirmatório da transformação do vetor binário contendo o promotor em <i>A. Tumefaciens</i>	38
Figura 12 – Foto dos discos foliares de tabaco regenerando após a transformação com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
Figura 13 – Foto das plantas regenerandas após a transformação com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
Figura 14 – PCR confirmatório da inserção do cassete de expressão nas linhagens transgênicas de tabaco (1-15).....	41

Lista de abreviaturas e siglas

GUS	β -glucuronidase
A ₆₀₀	Absorbância
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Ácido naftaleno acético
RNA	Ácido ribonucleico
BLAST	Basic local alignment search tool
BAP	Benzilaminopurina
cm	Centímetros
PVC	Cloreto de polivinila
cDNA	DNA complementar
EST	Estiquetas de sequencias expressas
FOREST	Eucalyptus genome sequencing project consortium
g	Força G
GW	Genome walking
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
g	Gramas
°C	Graus Celcius
kb	Kilobases
l	Litros
LB	Luria-Bertani
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
M	Molar
MS	Murashige & Skoog
ng	Nanogramas

nm	Nanometros
pb	Pares de base
p/v	Partes por volume
%	Porcento
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos

Resumo

A produção de eucalipto no Brasil, impulsionada pelo avanço na tecnologia florestal, tem alcançado índices satisfatórios a nível mundial nos últimos anos. No entanto, apesar de todo o desenvolvimento já obtido, a realização de novas pesquisas que tenham como objetivo aumentar a produtividade do eucalipto com áreas cultivadas reduzidas é muito relevante. A associação do melhoramento genético convencional com técnicas modernas de cunho biotecnológico é imprescindível para que tal benefício seja alcançado. Dentre as ferramentas moleculares necessárias para que tais objetivos sejam atingidos, a identificação e caracterização de promotores órgão-específico representa uma prioridade. Nesse contexto, um EST de eucalipto com expressão específica em raiz foi identificado pelo nosso grupo junto ao banco de dados do projeto FORESTs. A região promotora correspondente foi então amplificada usando a técnica de *genome walking*. A fim de dar continuidade ao processo de caracterização funcional deste promotor, no presente estudo o fragmento amplificado foi sequenciado, um cassete de expressão contendo o referido promotor foi construído, e plantas transgênicas de tabaco contendo tal cassete foram obtidas visando futuras análises funcionais.

Palavras chave: Eucalyptus, Promotores, Tecido-especificidade, Expressão Gênica

Abstract

The production of eucalyptus in Brazil, driven by advance in forestry technology, has achieved worldwide satisfactory rates in recent years. However, despite all the development already obtained, the researches that aim to increase the productivity of eucalyptus with reduced cultivated areas are very relevant. The combination of conventional breeding with modern biotechnology techniques was essential to reach this benefit. Among the molecular tools necessary to ensure these goals, the identification and characterization of organ-specific promoters are a priority. In this context, a eucalyptus EST with specific expression in roots was identified by our group in the FORESTs project database. The promoter region of this gene was then amplified using a genome walking technique. Aiming the functional characterization of this promoter, in the present study, the amplified fragment was sequenced, an expression cassette containing the promoter was constructed and transgenic tobacco plants containing this cassette were obtained.

Keywords: Eucalyptus, Promoters, Tissue-specificity, Gene expression

Sumário

Lista de figuras	
Lista de abreviaturas e siglas	
Resumo	Pg.
Abstract	
1. Introdução	13
2. Fundamentos Teóricos	17
2.1. Projeto Genoma do Eucalipto (FORESTs).....	17
2.2. Promotor.....	17
2.3. Análises in silico.....	18
2.4. RT-PCR.....	18
2.5. PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	20
2.6. Genome Walking.....	21
2.7. Vetor binário pCAMBIA-1381z.....	22
3. Objetivo.....	24
4. Materiais e Métodos	25
4.1. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados no GW.....	25
4.2. Desenho dos Oligonucleotídeos.....	26
4.3. Construção do cassete de expressão.....	26
4.4. Confirmação da correlação do posicionamento do fragmento em relação ao EST.....	27
4.5. Obtenção de plantas de tabaco para transformação.....	28
4.6. Produção de células competentes de Agrobacterium tumefaciens.....	28
4.7. Transformação do vetor binário em células competentes de A. tumefaciens.....	28

4.8. Preparação da cultura de <i>A. tumefaciens</i> e infecção dos discos foliares de tabaco.....	29
4.9. Regeneração de plantas transformadas.....	30
4.10. Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas.....	31
5. Resultados e Discussões.....	32
5.1. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por GW.....	32
5.2. Construção do cassete de expressão.....	35
5.3. Transformação do vetor binário em células competentes de <i>A. Tumefaciens</i>	37
5.4. Regeneração de plantas transformadas.....	38
5.5. Confirmação da inserção por PCR usando DNA genômico.....	40
6. Conclusões e Perspectivas	43
7. Referências Bibliográficas	44
8. Anexos.....	47
8.1. Mini-preparação de plasmídeos por lise alcalina.....	47
8.2. Produção de células competentes de <i>E. Coli</i>	48
8.3. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> DH5α.....	49
8.4. Produção de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
8.5. Transformação do vetor binário em células competentes de <i>A. Tumefaciens</i>	50
8.6. Extração de DNA de tabaco.....	51

1. Introdução

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

A versatilidade do eucalipto lhe confere inúmeras aplicações industriais. Algumas espécies são utilizadas para a produção de celulose, enquanto de outras são extraídos óleos essenciais com os quais são fabricados produtos de limpeza, alimentícios, perfumes e medicamentos. Com a madeira são tradicionalmente produzidas tábuas, sarrafos, ripas, vigas e postes, carvão vegetal, móveis, entre outros.

O eucalipto oferece diversas vantagens em comparação a outras espécies florestais utilizadas no mundo para a produção de celulose, inclusive as nativas. O clima favorável do Brasil e o avanço alcançado na pesquisa e tecnologia florestal possibilitam seu corte em apenas sete anos. O país é o maior produtor mundial de celulose de eucalipto com 220 empresas em 450 municípios, localizados em 17 estados e nas cinco regiões. Com 1,3 milhão de hectares de área plantada de eucalipto para fins industriais, gera 114 mil empregos diretos (indústria 67 mil, florestas 47 mil) e 570 mil empregos indiretos (Bracelpa, 2008).

A exploração de áreas de Florestas Nativas aliada à exploração das Florestas Plantadas gera mais de 2 milhões de empregos, contribui com mais de US \$ 20 bilhões para o PIB, exporta mais de US\$ 4 bilhões (8% do agronegócio) e contribui com 3 bilhões de dólares em impostos, ao ano, arrecadados de 60.000 empresas.

Com base nesses dados observa-se a importância do eucalipto por ser uma espécie de uso múltiplo com possibilidade de atender a todos os segmentos descritos, principalmente para papel e celulose, e energia, onde historicamente deu contribuição especial (Embrapa Florestas, 2003).

No entanto, apesar de todo o desenvolvimento já obtido, a realização de novas pesquisas que tenham como objetivo aumentar a produtividade do eucalipto em áreas cultivadas reduzidas é de extrema importância. Tal benefício foi em parte alcançado fazendo-se uso de melhoramento genético convencional e, atualmente, do melhoramento genético empregando técnicas modernas. Como resultado, um aumento de produtividade de 71% foi obtido no período compreendido entre os anos 1980 e 2007 (Bracelipa, 2008).

Vários patógenos, principalmente fungos, atacam o eucalipto desde mudas até árvores adultas causando significativos impactos econômicos e ambientais (Ciesla *et al*, 1996). As consequências negativas deste processo podem ser amenizadas fazendo-se uso de recursos biotecnológicos. As abordagens biotecnológicas visando à resistência a doenças representam uma alternativa atraente na agricultura contemporânea complementando abordagens tradicionais de melhoramento vegetal ou tratamentos químicos. Nesse caso, a engenharia genética visando a produção de plantas geneticamente modificadas representa uma alternativa atraente, especialmente no contexto das doenças que são insuficientemente controladas pelos meios tradicionais referidos acima (Altpeter *et al*, 2005).

Dentre as ferramentas moleculares necessárias para a produção de transgênicos, a identificação e caracterização de promotores órgão-específicos ou estímulo-dependentes representa uma prioridade. O promotor é uma parte

importante da região regulatória de um gene estando situado em sua extremidade 5'. A disponibilidade de promotores com expressão em dado órgão/tecido tem um grande apelo biotecnológico, já que os mesmos podem ser usados em construções gênicas que visam à produção de transgênicos para plantio comercial, nos quais a expressão generalizada do transgene na planta não irá ocorrer.

Numa breve consulta em bancos de patentes de promotores feita pelo nosso grupo, verificou-se que as patentes relacionadas ao gênero *Eucalyptus* se concentram em poucos promotores, os quais modulam a expressão preferencial em madeira, como o promotor do gene que codifica uma celulose sintetase (WO2007/141705), e o promotor do gene que codifica a cinamil álcool desidrogenase (US5633439); ou ainda expressão tecido-vascular, como o promotor do gene *COMT* (US20040146904). Na maioria dos casos, entretanto, os promotores utilizados e patenteados são provenientes de outras espécies florestais, como por exemplo, o *Populus* cujo genoma está completamente seqüenciado. A caracterização de promotores órgão/tecido específicos representa, portanto, um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação genética em eucalipto (Sasaki, 2008).

Nesse contexto, a identificação e análise de promotores com expressão específica em dado órgão/tecido colaboram para um aprofundamento dos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no processo de expressão gênica e de diferenciação tecidual, além de facilitar a obtenção de cassetes de expressão que permitam a expressão dos genes de interesse nos tecidos alvos em que esses promotores estejam ativos, possibilitando assim um aprimoramento dos processos biotecnológicos.

Como parte de um projeto abrangente voltado para a identificação e clonagem de promotores com expressão órgão/tecido-específica em eucalipto, nosso grupo identificou recentemente, no banco de dados do Projeto EST (etiquetas de seqüências expressas) do Eucalipto (FORESTs), um EST com expressão específica em raiz (Soprano, 2007). A expressão deste EST foi validada por RT-PCR empregando RNA total extraído de diferentes órgãos/tecidos de eucalipto, e em seguida, a sua região promotora foi amplificada por *genome walking* (GW) e clonada em vetor específico (Soprano, 2007). Entretanto, para que a especificidade de expressão desse promotor seja confirmada, experimentos de expressão estável em planta modelo são necessários.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos obter um cassete de expressão contendo tal promotor e inseri-lo em plantas transgênicas de tabaco visando a sua futura caracterização funcional.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Projeto Genoma do Eucalipto (FORESTs)

Projeto Genoma do Eucalipto (FORESTs), em cuja primeira etapa foi realizado o sequenciamento do genoma expresso do eucalipto, tornou-se um referencial para a pesquisa molecular desta espécie. O projeto identificou 15.000 genes através do sequenciamento de aproximadamente 123.889 ESTs provenientes de bibliotecas de diferentes tecidos de eucalipto, as quais foram agrupadas em 33.080 *contigs* que representam o transcriptoma desta importante espécie florestal. Projetos com tais objetivos disponibilizam informações importantes que permitem não só a identificação e clonagem de genes como também viabilizam a identificação das principais seqüências envolvidas na regulação dos mesmos. A disponibilidade de seqüências regulatórias, em especial promotoras, tem um grande apelo biotecnológico já que muitas delas podem ser usadas em construções gênicas que visam a produção de transgênicos com características melhoradas para a produção comercial (Soprano, 2007). Dentre esses, destacam-se os promotores órgão-específicos cuja utilização permite dirigir a expressão dos transgenes em órgãos/tecidos de interesse (Sanders *et al.*, 1987).

2.2. Promotores

O promotor é o processador central da regulação de um gene, uma vez que contém os sítios de ligação para a RNA polimerase e para os fatores gerais de transcrição responsáveis pela transcrição gênica. Por definição compreende a região 5' da seqüência transcrita. A região promotora de um gene eucarioto em geral possui uma seqüência conservada (T/A)A(A/T) a aproximadamente 30 pares de bases (pb) do ponto de início da transcrição, a qual é denominada TATA Box, e elementos

promotores proximais que são localizados a aproximadamente 100 (CCAAT Box) e 200 pb (GC Box) acima do ponto de início da transcrição (Griffiths *et al.*, 2005).

Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos e ocorrem através de uma intrincada rede de interações envolvendo os elementos citados acima e outros elementos localizados mais distantes do ponto de início da transcrição atuando como ativadores ou repressores (Ohler & Niemann, 2001).

2.3. Análises *in silico*

Como mencionado, o banco de ESTs do projeto FORESTs representa uma preciosa ferramenta para avaliar o transcriptoma do eucalipto. Além de fornecer informações sobre as diferentes proteínas produzidas por essa planta, é possível inferir perfis de expressão gênica, porque bibliotecas de cDNA não normalizadas foram utilizadas na sua confecção. Portanto, a frequência de um EST de qualquer gene está correlacionada com os níveis transcritos nos órgãos/tecidos a partir do qual as bibliotecas de cDNA foram construídas. Assim, a seleção de genes candidatos com padrão de expressão desejado pode ser realizada *in silico* empregando-se tais informações.

2.4. Validação Biológica por RT-PCR

Uma vez selecionados *in silico*, os genes candidatos identificados devem ter a sua expressão gênica validada em ensaios biológicos específicos, e a RT-PCR é uma das técnicas que pode ser empregada nesse processo. A reação da

transcriptase reversa (RT) seguida da reação em cadeia da polimerase (PCR), utiliza RNA de fita simples como molde. Essa técnica é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, uma vez que é capaz de analisar o RNA que é transcrito em determinado órgão/tecido com extrema sensibilidade (Willard *et al.*, 1999)

No caso do gene candidato com expressão em raiz de eucalipto utilizado no presente trabalho, a sua validação foi realizada empregando-se RNA total extraído de raiz, folha, caule de muda, feixe cambial de tronco, fruto e botão floral de *E. grandis*. O RNA foi submetido à transcrição reversa, e em seguida, os produtos foram amplificados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos genes-específicos. Para verificar a qualidade dos cDNAs obtidos na transcrição reversa bem como a eficiência da reação de PCR, um gene controle com expressão ubíqua foi amplificado em paralelo.

Nesta etapa foi avaliada a presença ou ausência de bandas correspondentes aos transcritos do gene candidato em cada órgão analisado. Os resultados obtidos na validação do candidato com expressão específica em raiz estão representados na Figura 1 (Soprano, 2007).



Figura 01 – Validao biolgica do candidato com expresso especfica em raiz por RT-PCR. Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etdio, dos produtos de amplificao obtidos para o gene candidato (Raiz) e para um normalizador com expresso ubqua (GAPDH) (Soprano, 2007).

2.5. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O PCR quantitativo (qPCR), ou PCR em tempo real,  uma forma confivel de se detectar e quantificar os produtos gerados durante cada ciclo da reao em cadeia da polimerase (PCR), os quais so diretamente proporcionais  quantidade de DNA molde presente na reao de amplificao (Freeman *et al.*, 1999; Ginzinger, 2002).

Para efeito de comparao, a expresso relativa do candidato inicialmente validado pelo nosso grupo nas anlises de RT-PCR como possuindo um perfil de expresso especfico em raiz (Figura 1), foi tambm analisada por qPCR (Figura 2). Nesse caso, verificou-se que a sua expresso ocorria exclusivamente em razes de *E. grandis*, sendo a mesma majoritria em razes obtidas de plantas de propagao vegetativa, seguida de plantas com 6 meses, e de uma menor expresso em razes

provenientes de plântulas. A detecção nos demais órgãos foi nula, ou seja, não se detectou transcritos desse gene em folhas e feixes cambiais de plantas com 6 anos e 1 mês, e de plantas com 2 anos e 7 meses, bem como em folhas e caule de plantas com 6 meses (Sasaki, 2008).

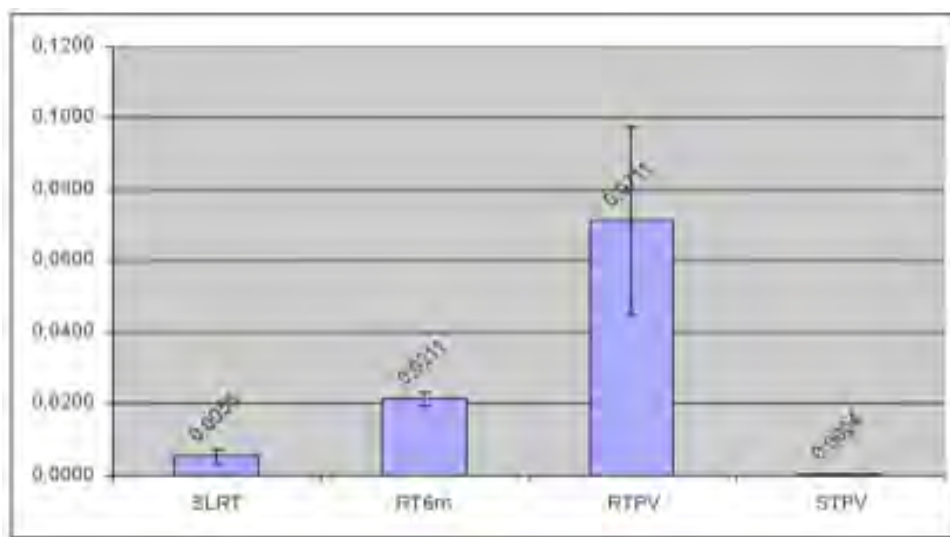


Figura 02 – Expressão relativa do candidato específico de raiz em diferentes órgãos, de diferentes idades, de *E. grandis*. SLRT – raiz de plântulas; RT6m – raiz de plantas com 6 meses; STPV e RTPV – caule e raiz de eucalipto proveniente de propagação vegetativa *in vitro*. As barras correspondem à média mais desvios para três reações independentes (Sasaki, 2008).

2.6. Genome Walking (GW)

A técnica de GW permite amplificar regiões localizadas à montante de uma sequência conhecida (Siebert *et al.*, 1995) empregando-se oligonucleotídeos específicos da própria sequência alvo.

O *GenomeWalkertm Universal Kit* (Clontech) é normalmente usado na clonagem de regiões promotoras utilizando-se bibliotecas de DNA genômico especialmente construídas para esse fim. Essas bibliotecas são construídas a partir

de DNA genômico da espécie alvo digerido por diferentes enzimas de restrição, sendo os fragmentos oriundos da digestão ligados a adaptadores fornecidos pelo kit. Após a construção das bibliotecas, dois *rounds* de PCR por biblioteca são então realizados. O PCR primário usa os oligonucleotídeos mais externos relacionados ao adaptador (AP1) e à sequência conhecida (GSP1). Uma alíquota diluída (1:50) do PCR primário é então usada como molde para o PCR secundário que utiliza os oligonucleotídeos mais internos (AP2 e GSP2) à região amplificada (Figura 3).

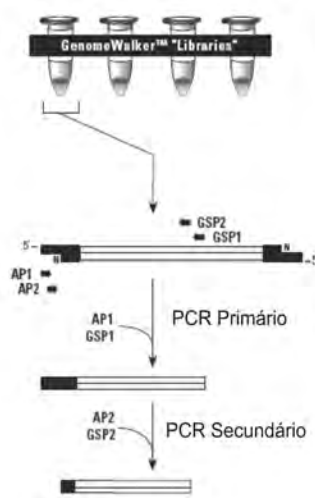


Figura 03 – Representação esquemática da metodologia do *genome walking*. As extremidades em preto do fragmento de DNA representam os adaptadores e os oligos gene-específicos estão representados como GSP. Adaptado Clontech Catalogue.

2.7. Vetor binário pCAMBIA-1381z

O vetor binário pCAMBIA-1381z (Cambia) foi especialmente desenhado para testar promotores em planta (Figura 4). Nesse vetor o promotor a ser testado é clonado em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* que codifica a enzima β -glucuronidase (GUS). A região codificadora do gene repórter é interrompida por um

íntron (catalase) para evitar expressão inespecífica na planta. Além disso, o vetor apresenta um gene de resistência à canamicina como agente de seleção bacteriano e um gene de resistência à higromicina para seleção em plantas.

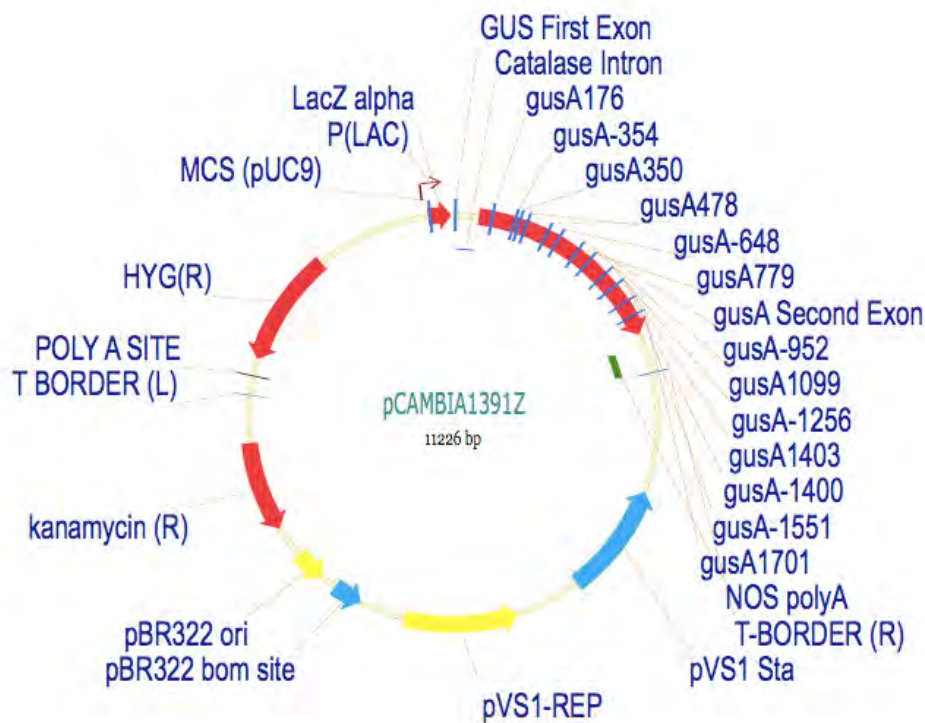


Figura 04 – Representação esquemática do plasmídeo pCambia-1381z (Cambia) utilizado na construção dos cassetes de expressão para agroinfiltração e transformação estável empregando *Agrobacterium tumefaciens*. O promotor utilizado nesse trabalho foi clonado entre os sítios *Bam*HI e *Nco*I fusionado com o gene repórter *uidA* (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/home.htm>).

3. Objetivos

O presente projeto teve como objetivo iniciar a caracterização funcional do promotor de um gene de *Eucalyptus grandis* com expressão específica em raiz. Para tal, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

A) Finalizar o seqüenciamento do promotor em questão.

B) Construir um cassete de expressão contendo o referido promotor em fusão transcricional com o gene repórter *uidA* (GUS) e inseri-lo em um vetor de expressão em plantas.

C) Obter plantas transgênicas de tabaco transformadas com o cassete de expressão descrito acima.

4. Materiais e Métodos

4.1. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados no *genome walking* (GW)

Os produtos de PCR derivados do GW (de 1,4 kb; 2,9 kb; 3,0 kb, respectivamente; Soprano, 2007) representando o promotor em estudo foram clonados no vetor pGEM-Teasy (Promega) e seqüenciados. Para a realização de tal seqüenciamento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos por lise alcalina conforme protocolo descrito (Sambrook *et al.*, 1989).

O seqüenciamento foi realizado utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). A reação foi preparada utilizando 200 ng do produto de PCR clonado em vetor, 1 µl de tampão (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 5 mM MgCl₂), 0,6 µl de oligonucleotídeo específico (10 µM), 2,0 µl do mix de *BigDye* e água para completar 10 µl. As reações foram processadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) com ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 1 minuto, seguido de um ciclo com desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, o qual foi repetido 25 vezes. O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado e levado ao seqüenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems) adicionado de 10 µl de formamida. Pelo menos três clones de cada fragmento foram seqüenciados.

As sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas ao banco FORESTS usando a ferramenta BLAST e alinhadas empregando o algoritmo *BLAST 2 Sequences* disponível no sítio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>.

4.2. Desenho dos Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos adicionais empregados para completar o seqüenciamento dos fragmentos clonados foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express* seguindo os seguintes critérios: tamanho do oligonucleotídeo (mínimo: 18 bases; máximo: 25 bases); temperatura de “annealing” (mínimo: 50°C; ótimo: 55 °C; máximo 60 °C); e conteúdo em GC (mínimo: 40%; ótimo: 50%; máximo: 60%).

4.3. Construção do cassete de expressão

Para a construção do cassete de expressão foi utilizado o vetor binário pCAMBIA-1381z (Cambia) (Figura 04), que contém um íntron inserido na região codificadora do gene repórter *uidA* (GUS). Para tal, o fragmento promotor de 1350 pb que se encontrava inicialmente inserido no vetor pGEM-Teasy foi amplificado por PCR visando à adição dos sítios de restrição *Bam*HI (5' terminal; 5' - CGACGGATCCGCTGGTATACCGTGAAGATCAAT - 3') e *Nco*I (3' terminal; 5' - TATACCATGGTTTTTTCCTCCTCGCCGGCC - 3') em suas extremidades (os sítios de restrição estão sublinhados). O sítio *Nco*I visa permitir a correta inserção do promotor em fusão transcricional com o início da região codificadora do gene *uidA* presente no pCAMBIA.

O produto de amplificação contendo o promotor putativo foi então purificado em gel de agarose, digerido com as enzimas de restrição citadas e inserido no vetor pCAMBIA-1381z igualmente digerido e purificado. A reação de ligação foi realizada utilizando a enzima T4 DNA ligase segundo as instruções do fabricante (Fermentas).

Após a ligação, células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* preparadas conforme protocolo descrito no anexo 8.2 (Sambrook *et al.*, 1989) foram transformadas empregando choque térmico. Após a transformação (Anexo 8.3), as bactérias foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select Agar* em água deionizada, pH 7,0) adicionado de 100 μ g/ml de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Para confirmar a presença do fragmento inserido no referido vetor, os plasmídeos recombinantes foram purificados por lise alcalina conforme anexo 8.1 (Sambrook *et al.*, 1989) e submetidos à digestão com enzimas de restrição (*Nco*I e *Bam*HI) com posterior análise do produto de digestão em gel de agarose 1%. Uma reação de PCR confirmatória utilizando um oligonucleotídeo promotor-específico e um oligonucleotídeo GUS-específico foi adicionalmente realizada.

4.4. Confirmação da correlação do posicionamento do fragmento em relação ao EST

Para confirmar experimentalmente o posicionamento do fragmento promotor (5B; ~1,4 kb) em relação ao seu respectivo EST, um PCR confirmatório foi realizado. Nesse caso foi empregado DNA genômico de eucalipto, um oligonucleotídeo posicionado no sentido senso do fragmento seqüenciado (5'TCAGCTAGCATATGTGGAAAGC3') e o oligo GSP2 (5'TGGAGGAAGAAGAAGAGTCAGA3'), o qual é complementar à seqüência do EST depositada no banco. Uma amostra de DNA plasmidial pGEMT-Easy contendo o fragmento 5B clonado por GW foi usada como controle positivo. A amplificação foi realizada em um termociclador (PTC 100 – MJ Research) adotando-se uma

desnaturação prévia por 3 minutos a 94 °C, e um ciclo básico de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos à temperatura de *annealing* de 65 °C e 1 minuto a 72 °C, o qual foi repetido 40 vezes e seguido por mais 10 minutos de amplificação a 72 °C. Os produtos gerados por esta amplificação foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e observados sob a luz ultravioleta.

4.5. Obtenção de plantas de tabaco para transformação

Plantas de tabaco selvagem (*Nicotiana tabacum* SR1) foram obtidas através do cultivo de sementes esterilizadas pela incubação em álcool 70% por 1 min, seguida de uma incubação em hipoclorito de sódio 50% com Tween-20 por 20 min, e posterior lavagem em água deionizada autoclavada por 5 vezes. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placa com meio Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog, 1962) a 4.4 g/l, pH 5.7, contendo Phytigel a 2.29 g/l.

4.6. Produção de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Para a transformação estável de tabaco com a construção contendo o cassete de expressão Promotor:GUS, células competentes da linhagem LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* foram produzidas (anexo 8.4). Essa linhagem tem genes de resistência à estreptomicina (origem plasmidial) e rifampicina (origem cromossômica) como agentes de seleção. O procedimento utilizado para indução de competência foi baseado no protocolo de Lacorte & Romano (1998).

4.7. Transformação do vetor binário em células competentes de *A. tumefaciens*

O cassete de expressão Promotor:GUS inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z foi então transformado em células de *A. tumefaciens* linhagem LBA4404

tornadas competentes (Anexo 8.5). A transformação foi realizada seguindo o protocolo descrito por Lacorte & Romano (1998). O vetor binário pCAMBIA-1381z possui gene de resistência a canamicina como agente de seleção bacteriano. Para confirmação da transformação, colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido a 28°C por 20 h, e após a extração dos plasmídeos recombinantes por lise alcalina, os mesmos foram submetidos à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos internos, um no sentido senso posicionado junto ao promotor e o outro no sentido reverso na região codificadora do gene GUS.

4.8. Preparação da cultura de *A. tumefaciens* e infecção dos discos foliares de tabaco

Para a transformação dos discos foliares de tabaco, uma colônia isolada de *A. tumefaciens* da linhagem LBA4404 transformada com o cassete Promotor:GUS foi previamente inoculada em 10 ml de meio líquido LB, sem a presença dos antibióticos de seleção. A cultura foi incubada sob agitação a 150 rpm por 16 horas a 28°C até atingir a absorbância a 600 nm igual a 1.5. Uma alíquota do inoculo foi então diluída até atingir uma absorbância a 600 nm de 0.1 para então ser utilizada na co-cultura com os discos foliares de tabaco (Aragão *et al.*, 2002).

Em um fluxo estéril, discos foliares de ~2 cm de diâmetro provenientes de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) cultivado *in vitro* foram cortados de folhas jovens e colocados em uma placa de Petri umedecida com água deionizada estéril no intuito de manter os explantes hidratados. Um mililitro da cultura diluída de *A. tumefaciens* foi adicionado a 10 ml de LB líquido num tubo de centrifuga estéril de 50 ml. Com uma pinça estéril, os explantes foram colocados no tubo e a co-cultura foi mantida à temperatura ambiente por 5 min sob leve agitação. Em seguida, os discos foliares

foram transferidos para uma nova placa de Petri contendo papel de filtro estéril para retirar o excesso de bactérias.

Os discos foliares co-cultivados foram transferidos para placas de Petri contendo meio MS sólido, pH 5.7, suplementado com 1 µg/ml de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), sendo as mesmas mantidas no escuro por 48 horas a 28°C, tempo necessário para a infecção da bactéria.

4.9. Regeneração de plantas transformadas

Após 48 horas de incubação no escuro, os explantes transformados foram transferidos para novas placas com meio MS sólido suplementado com 2 mg/L de BAP, 300 mg/L do bacteriostático cefotaxima, e 50 mg/ml do antibiótico de seleção higromicina-B. Nesse meio, o tecido vegetal não transformado não irá apresentar regeneração já que não apresenta resistência a higromicina-B, enquanto que a cefotaxima irá inibir o crescimento da *A. tumefaciens*. Todas as placas foram mantidas em sala de cultivo sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o aparecimento de partes aéreas no material regenerante, essas foram transferidas para frascos de vidro estéreis contendo meio MS em presença dos agentes de seleção e do hormônio ANA para induzir o enraizamento.

Após o estágio de enraizamento, as plantas foram transferidas para copos de plástico de 300 ml contendo vermiculita e terra vegetal na proporção de 1:2, respectivamente, e aclimatadas em caixas cobertas fechadas parcialmente com filme PVC transparente.

Após algumas semanas, discos foliares de 2 cm de diâmetro foram coletados de tais plantas e o DNA genômico extraído de acordo com o protocolo de Konieczny

et al. (1993). As plantas foram transferidas para a estufa em vasos maiores, para posterior coleta de sementes.

4.10. Confirmação da inserção do cassete de expressão nas plantas transformadas

A confirmação da inserção do cassete de expressão nas linhagens transgênicas regeneradas foi realizada por PCR utilizando 50 ng/ml de DNA genômico extraído (Anexo 8.6) de tecido foliar de cada linhagem (total de 15 plantas de eventos independentes). DNA genômico extraído de tabaco selvagem (WT) foi usado como controle. Para a amplificação foram utilizados, respectivamente, um oligonucleotídeo senso posicionado junto à região promotora, e o oligonucleotídeo reverso GUSR (5' GTCTGCCAGTTCAGTTCGTTGTTC 3') complementar a região codificadora do gene GUS . Uma temperatura de anelamento de 56,6°C foi utilizada, gerando um produto de amplificação de 950 pb.

5. Resultados e Discussão

5.1. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por GW

No início da realização do presente trabalho, três produtos de amplificação com tamanho variando entre 1400 e 3000 pares de bases (pb) (Figura 05) haviam sido gerados durante os ensaios de *genome walking* visando a clonagem da região 5' do gene candidato com expressão específica em raiz de eucalipto previamente validado (Soprano, 2007).

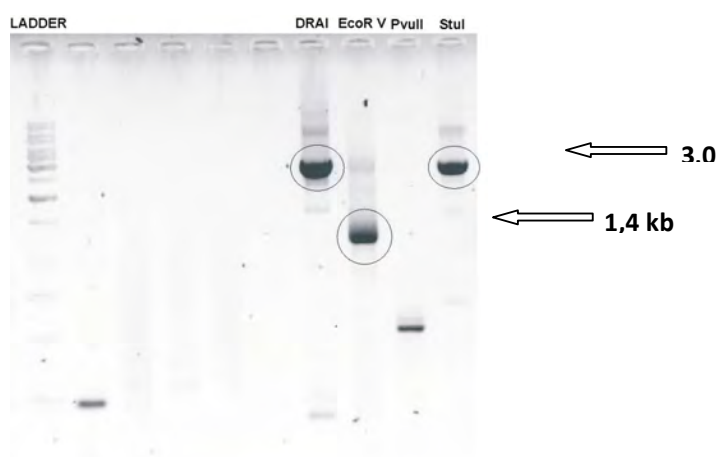


Figura 05 – Produtos de amplificação obtidos para o candidato específico de raiz após o PCR secundário do *genome walking*. As 4 bibliotecas utilizadas para amplificação com o oligo GSP2 estão anotadas com os nomes das enzimas de restrição que as geraram. Ladder 1 kb; 1A - 1D (controles negativos de amplificação). Os produtos foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os círculos representam os fragmentos purificados e clonados. Imagem invertida.

Os referidos fragmentos (denominados respectivamente 2B, 5B e 7B) foram purificados e clonados em vetor pGEMT-easy para posterior seqüenciamento. Em função do tamanho de tais fragmentos houve a necessidade de se realizar reações de seqüenciamento em série, empregando para tal, oligonucleotídeos desenhados com base nas seqüências recém-obtidas.

Devido ao seu tamanho (~1,4 kb) e maior facilidade de clonagem (se comparado aos fragmentos maiores), optou-se por realizar o seqüenciamento completo do fragmento 5B, e em seguida utilizá-lo nas análises funcionais. A sequência de nucleotídeos desse fragmento foi alinhada com a sequência do EST validado como apresentando expressão específica em raiz (Soprano, 2006), e uma região de sobreposição entre elas foi observada (Figura 06). Esse resultado sugere que o fragmento clonado está efetivamente situado na porção 5' do EST usado como ponto de partida nos experimentos de GW. Adicionalmente, quando submetida ao banco de ESTs do eucalipto utilizando a ferramenta BLAST foi possível observar que tal sequência não apresenta similaridade com nenhuma outra sequência depositada, sugerindo que o fragmento amplificado é uma região ainda não caracterizada do genoma do eucalipto.

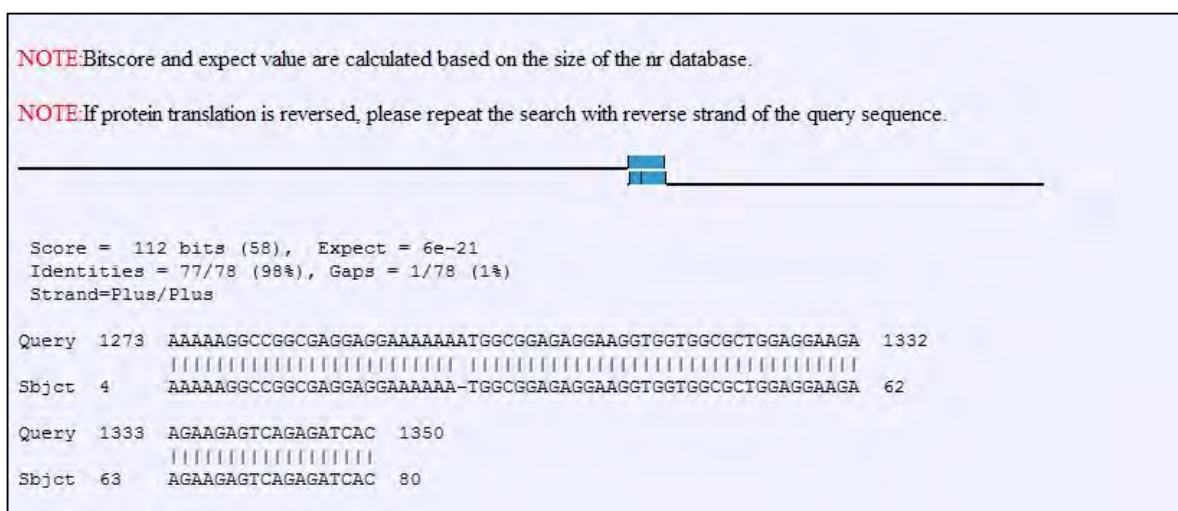


Figura 06 – Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento 5B com a sequência do EST validado disponível no banco FORESTs. As seqüências correspondentes à região de sobreposição estão representadas em azul na parte superior da figura. Query = Seqüência amplificada por GW e

clonada em pGEM-Teasy; Sbjct = EST validado (EGMCRT3145G04.g). O alinhamento foi obtido empregando BLAST 2 Sequences (Bl2Seq).

Ainda com o intuito de confirmar experimentalmente o posicionamento do fragmento 5B em relação ao seu respectivo EST, um PCR confirmatório foi realizado. Nesse caso foi empregado DNA genômico de eucalipto, um oligonucleotídeo posicionado no sentido senso do fragmento seqüenciado e o oligo GSP2 usado na segunda reação de GW, o qual é complementar à seqüência do EST depositada no banco. Uma amostra de DNA plasmidial contendo o fragmento clonado por GW foi usada como controle positivo. Os resultados obtidos confirmaram que o produto amplificado nas reações de GW está efetivamente situado na porção 5' do EST validado e tem correlação com o mesmo (Figura 07).

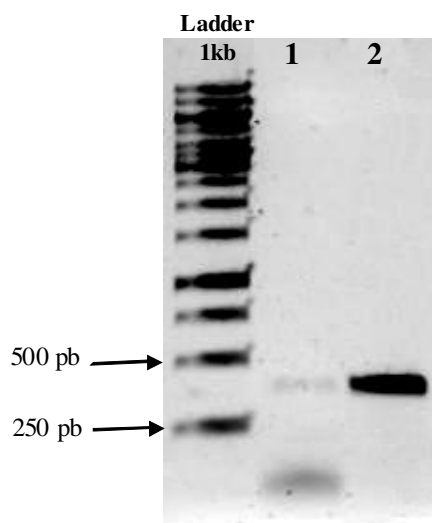


Figura 07 – Confirmação do posicionamento do fragmento amplificado em relação ao EST selecionado no banco FORESTs. As amplificações foram realizadas usando DNA genômico (coluna 1) e o plasmídeo pGEMT-Easy contendo o fragmento 5B (coluna 2). O tamanho esperado do fragmento é de 371pb. Ladder 1kb da MBI Fermentas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

5.2. Construção do cassete de expressão

Visando a sua caracterização funcional, um cassete de expressão contendo o fragmento 5B em fusão transcricional com o gene *uidA* (que codifica a enzima β -glucoronidase) foi construído (Figura 08). O vetor binário escolhido para a construção do cassete de expressão foi o pCAMBIA-1381z (CAMBIA). Nessa etapa, o fragmento correspondente ao promotor putativo (1350 pb) foi amplificado por PCR (Figura 09) para inserção de sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI (na porção 5' terminal) e *Nco*I (na porção 3' terminal) em suas extremidades.

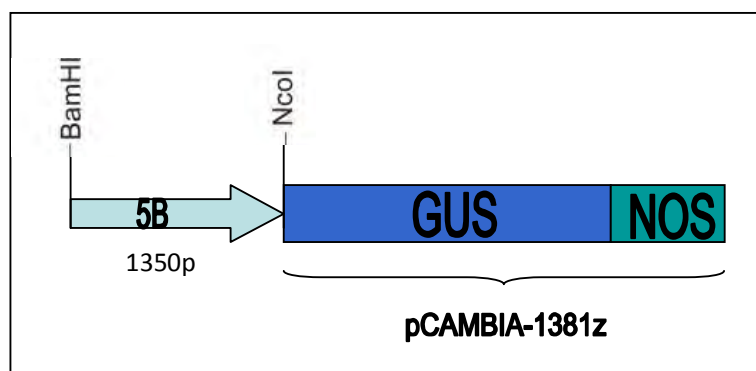


Figura 08 – Representação esquemática do cassete de expressão contendo o fragmento 5B (1350 pb) em fusão transcricional com o gene *uidA* (GUS) inserido no vetor binário pCAMBIA-1381z. O terminador da nopalina sintetase (NOS) está representado.

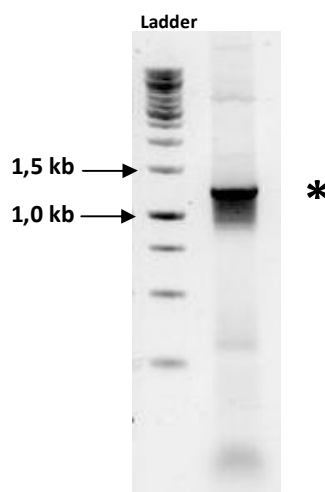


Figura 09 – Amplificação do fragmento 5B por PCR empregando os oligos contendo os sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nco*I. Ladder 1kb da MBI Fermentas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O produto de tamanho esperado derivado do PCR (asterisco na Figura 5) foi então isolado do gel de agarose e purificado utilizando o kit de purificação *Pure Link Quick Gel Extraction* (Invitrogen). Uma vez purificado, o produto foi digerido com as enzimas *Nco*I e *Bam*HI e ligado ao plasmídeo pCAMBIA-1381z igualmente digerido.

Após a transformação em *E. coli*, dez colônias positivas foram selecionadas para verificação da inserção. As bactérias foram crescidas em 1,0 ml de meio LB líquido e os plasmídeos extraídos por lise alcalina. Em seguida, uma digestão com as enzimas *Nco*I e *Bam*HI foi realizada para confirmar a presença do fragmento clonado no tamanho correto, descartando assim os falsos positivos. Como é possível constatar na Figura 10, todos os 10 clones analisados mostraram-se positivos. Adicionalmente, a correta inserção do promotor em relação o gene repórter foi atestada no seqüenciamento dos clones positivos obtidos.

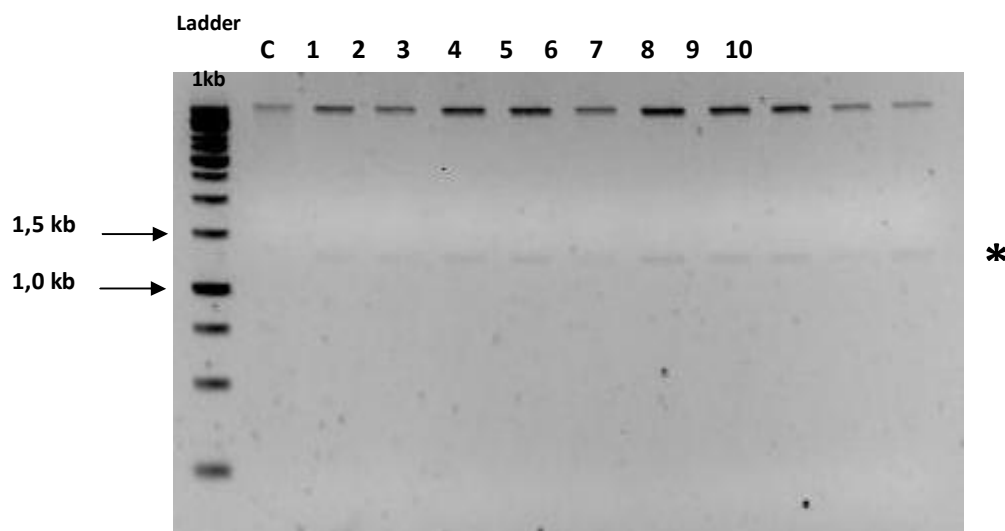


Figura 10 – Verificação da inserção do fragmento 5B no vetor pCambia-1381z por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Nco*I. C – pCambia-1381z digerido com *Nco*I e *Bam*HI sem a ligação com o fragmento 5B. Todos os clones analisados (1-10) apresentam o fragmento 5B (1350 pb – indicado pelo asterisco). Ladder 1kb da MBI Fermentas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

5.3. Transformação do vetor binário em células competentes de *A. tumefaciens*

O plasmídeo recombinante contendo o cassete de expressão foi então inserido em *A. tumefaciens* visando a posterior obtenção de plantas transgênicas de tabaco. A efetiva transformação do vetor binário em *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR utilizando oligonucleotídeos internos específicos. Como é possível observar na Figura 07, todas as colônias analisadas continham o produto de amplificação correspondente ao cassete de expressão. Como controle positivo foi utilizado células de *E. coli* contendo o plasmídeo recombinante (linha C na Figura 11).

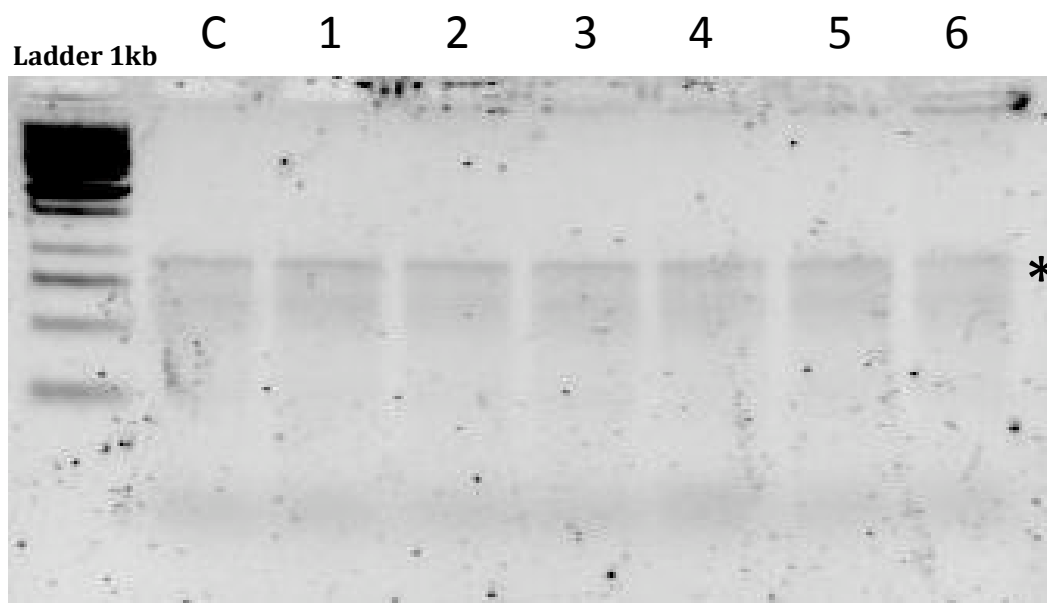


Figura 11 - PCR confirmatório da transformação do vetor binário contendo o promotor em *A. tumefaciens*. Ladder 1kb da MBI Fermentas. C- Controle positivo de amplificação. 1-6- Colônias testadas. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. O asterisco indica a posição do produto de amplificação esperado.

5.4. Regeneração de plantas transformadas

As células de *A. tumefaciens* obtidas na etapa anterior foram usadas para transformar discos foliares de tabaco. Após a transformação, os discos foram mantidos em placas de Petri contendo meio de cultura MS e os agentes de seleção descritos no item Material e Métodos. Após várias repicagens, verificou-se a indução da parte aérea nos explantes conforme observado na Figura 12.

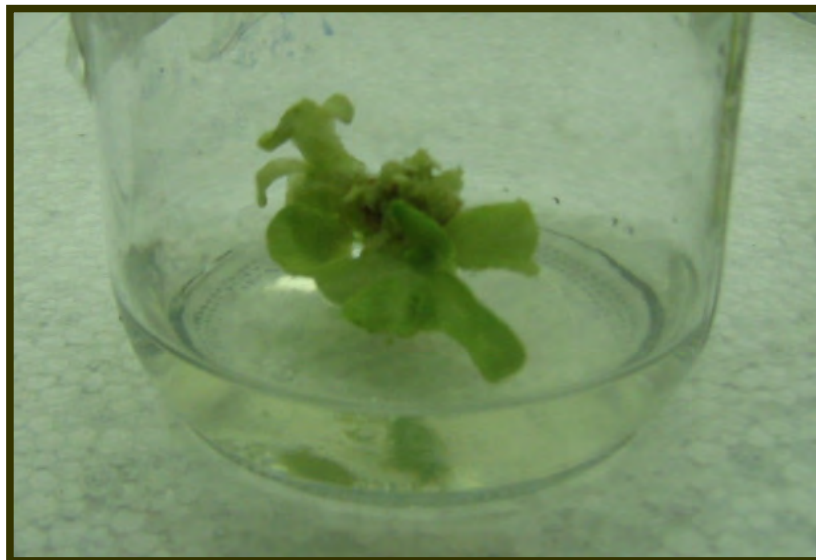


Figura 12 – Foto dos discos foliares de tabaco regenerando após a transformação com *Agrobacterium tumefaciens*.

A parte aérea foi então transferida para potes com meio MS adicionado de ANA para induzir o enraizamento, mantendo-se os agentes de seleção. Após algumas semanas foi possível constatar o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas transformadas. Essas plântulas foram em seguida transferidas para copos plásticos e aclimatadas para novo ambiente (Figura 13).



Figura 13 – Foto das plantas regeneradas após a transformação com *Agrobacterium tumefaciens*.

5.5. Confirmação da inserção por PCR usando DNA genômico

No total, quinze plantas transformadas (representando eventos independentes) foram recuperadas do processo de regeneração. Para confirmar se o cassete de expressão estava integrado nessas linhagens foi realizada a extração de DNA genômico de folhas empregando protocolo descrito por Konieczny (1993).

O DNA genômico extraído foi usado como molde em reação de PCR empregando os oligonucleotídeos descritos no item 4.10. A amplificação de um fragmento de tamanho esperado foi observada em todas as linhagens analisadas, com exceção de duas delas (linhagens 13 e 15) (Figura 14). No controle negativo, por outro lado, não houve amplificação. Esses resultados confirmam que o cassete

de expressão contendo o promotor em estudo encontra-se inserido em treze das quinze linhagens de plantas transgênicas obtidas no presente trabalho.

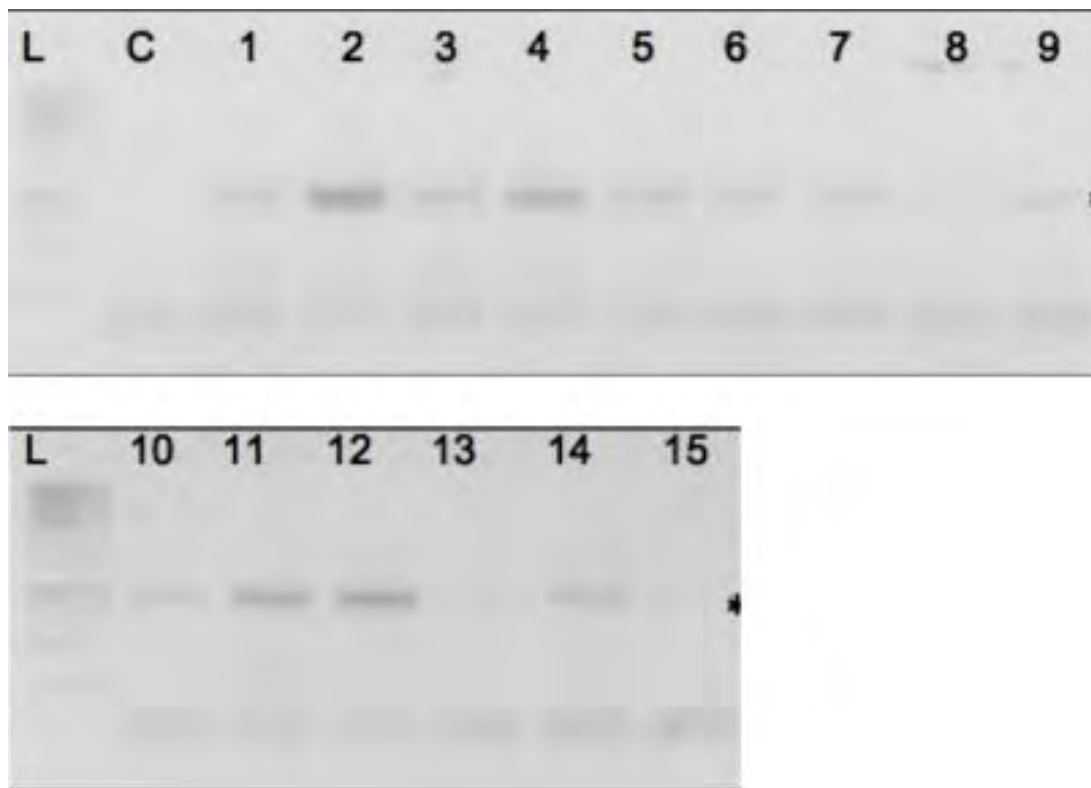


Figura 14 – PCR confirmatório da inserção do cassete de expressão nas linhagens transgênicas de tabaco obtidas (1-15). Amplicon esperado de 950 pb. C – Tabaco selvagem usado como controle negativo; L - Marcador MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Cabe ressaltar que uma etapa confirmatória adicional deveria ter sido realizada no intuito de verificar se a transcrição do gene repórter GUS estava ocorrendo nas raízes das linhagens transformadas. Para a realização dessas análises, entretanto, seria necessário extrair RNA total de raiz, o que poderia prejudicar ou destruir as plantas transgênicas obtidas. Dessa maneira, optou-se pela realização das referidas análises somente em plantas da geração R1.

Assim, as plantas transgênicas obtidas foram transplantadas para vasos maiores contendo terra vegetal e areia (2:1) e transferidas para casa de vegetação visando recuperar as sementes da geração R1.

6. Conclusões e perspectivas

Todos os objetivos originalmente propostos (seqüenciamento do promotor; construção de um cassete de expressão contendo o promotor em fusão transcricional com gene repórter; e inserção desse cassete em plantas transgênicas de tabaco) foram alcançados, o que permitiu a obtenção de 13 plantas de tabaco transformadas com o cassete de expressão contendo o promotor específico de raiz em fusão transcricional ao gene repórter *uidA* (β -glucuronidase).

Como continuidade desse projeto, pretende-se, após a obtenção da geração R1, extrair RNA total de raiz no intuito de verificar se a transcrição do gene repórter GUS está ocorrendo nas raízes das linhagens transformadas. Pretende-se, ainda, realizar as análises funcionais através de ensaios histoquímicos de GUS visando validar completamente a tecido-especificidade do promotor em estudo.

7. Referências Bibliográficas

- ALTPETER, F., VARSHNEY, A., ABDERHALDEN, O., DOUCHKOV, D., SAUTTER, C., KUMLEHN, J., DUDLER, R., SCHWEIZER, P. Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance. **Plant Molecular Biology**, v.57, p.271–283, 2005.
- ARAGÃO F. J. L., SANTOS M. O., MORAIS L. S., ROMANO E. Metodologias para transformação genética de Plantas-Modelo. Circular Técnica 15, ISSN 1516-4349, **EMBRAPA**, Brasília, DF, 2002.
- BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. Relatório de Desempenho do Setor de Celulose e Papel e Projeções 2007.(2007).
- CIESLA, W.M., M. DIEKMANN AND C.A.J. PUTTER. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 17. *Eucalyptus* spp. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1996.
- EMBRAPA FLORESTAS, Cultivo do Eucalipto, **Sistemas de Produção**, 4ISSN 1678-8281 Versão Eletrônica, 2003.
- FERREIRA E. M., GRATTAPAGLIA D. Extração de DNA genômico total de plantas. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa**, p.121-139, 3^a ed., 1998.
- FREEMAN, W.M., WALKER, S.J., VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, **BioTechniques**, v. 26, p.112-125, 1999.

- GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v.30, p. 503–512, 2002.
- GRIFFITHS, A.J.F., GELBART, W.M., MILLER, J.H., LEWONTIN, R.C, WESSLER, S.R., Suzuki D.T. RNA: Transcription and Processing In: Introduction to Genetic Analysis. 8rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, NY, 2005.
- JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A., BEVAN, M.V. GUS fusions β -glucoronidase as a sensitive and versatile marker in higher plants. **EMBO J.**, v.6, p.3901-3907, 1987.
- KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F.M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based makers. **The Plant J.**, v.4, n.2, p.403-410, 1993.
- LACORTE C., ROMANO E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. Em: BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. Manual de Transformação Genética de Plantas. **EMBRAPA** – Brasília, DF, 1998.
- LEITE, S. M. M. Variabilidade genética em uma população-base de *Eucalyptus grandis* Hill ex-Maiden através do marcador RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Dissertação, UNESP, Botucatu, Brasil, 1998.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Physiol. Plant**, v.15, p.473-497, 1962.
- OHLER, U., NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends in Genetics**, 17: 56- 60, 2001.

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

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 Res.**, v.15, p.1543-58, 1987

SASSAKI, F. T., 2008. Isolamento e Caracterização de Promotores Órgão-específicos a partir de informações do Banco FORESTs (Eucalyptus Genome Sequencing Project Consortium) - **Dissertação de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências. Botucatu, São Paulo. Brasil.

SIEBERT, P.D, CHENCHIK, A., KELLOG, D.E., LUKYANOV, K.A., LUKYANOV, S.A. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, v.23, p.1087-1088, 1995.

SOPRANO, A.S. Identificação e validação de ESTs órgão-específicos visando à clonagem de promotores em eucalipto. **Relatório FAPESP**. Processo nº 2006/50755-4 - Iniciação Científica.

8. Anexos

8.1. Mini-preparação de plasmídeos por lise alcalina

Referência: Kit Colunas Qiagen, modificado

- 1) Inocular uma colônia isolada em 3 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado. Após incubação durante toda a noite a 37°C, transferir aproximadamente 1,4 ml para o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- 2) Centrifugar a 14000 rpm durante 60 s, descartar o sobrenadante. Adicionar outros 1,4 ml da cultura de bactérias e centrifugar outros 60s. Ressuspender as bactérias em 300 µl de solução P1 utilizando vortex.
- 3) Adicionar 300 µl de solução P2. Agitar por inversão suave do tubo e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Não prolongar este período em excesso.
- 4) Adicionar 300 µl de solução P3. É importante agitar cada tubo por inversão suave logo após a adição de P3. Nesta etapa deve ser formado um precipitado branco.
- 5) Incubar as amostras no gelo por 20 min.
- 6) Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min e coletar com cuidado 700 a 800 µl do sobrenadante para um novo tubo. Evitar a coleta do precipitado que se forma na superfície da solução.
- 7) Se necessário, centrifugar novamente as amostras por 15 min e coletar 650 a 750 µl do sobrenadante para um novo tubo.
- 8) Adicionar 400 µl de isopropanol e incubar a -20°C por 1 hora.
- 9) Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min à temperatura ambiente.
- 10) Descartar o sobrenadante, adicionar 700 µl de etanol 70%, inverter o tubo com cuidado e centrifugar a 14000 rpm durante 5 min.

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

Soluções:

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

P2) NaOH 200 mM, SDS 1%

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

Armazenar a 4°C.

8.2. Produção de células competentes de *E. coli*

- 1) Transferir 2,5 mL de uma cultura de *E. coli* DH5α crescida overnight para 100 mL de meio SEB. Em seguida, crescer a cultura até uma absorbância a 650 nm igual a 0,3.
- 2) Dividir em dois tubos Falcon de 50 mL e centrifugar por 10 min a 4000 rpm a 4°C.
- 3) Resuspender o sedimento em 16,6 mL de FSB a 4°C.
- 4) Estocar a 4°C por 10 min.
- 5) Centrifugar por 10 min a 4.000 rpm a 4°C.
- 6) Resuspender em 4 mL de FSB gelado, e acrescentar 140 µL de DMSO e incubar por 10 min no gelo.
- 7) Adicionar mais 140 µL de DMSO e aliquotar um volume de 200 µL em tubos de 1,5 mL, colocando-se em seguida rapidamente em banho de sal, etanol e gelo.
- 8) Conservou-se a -70°C
- 9) Usar após 48h.

Soluções:

SEB⇒ LB +10 mM de MgCl₂ + 10 mM de MgSO₄

SEC⇒ Seb + 20 mM de glicose

FSB

Acetato de potássio pH 7,5	10 mM
KCl	100 mM
MnCl ₂ 4 água	45 mM
CaCl ₂ 2 H ₂ O	10 mM
Hexamine Cobalto	3 mM
Glicerol	10%

8.3. Transformação de células competentes de *E. coli* DH5α

- 1) Colocar o produto da ligação no tubo contendo as células competentes de *E. coli*;
- 2) Incubar a 0°C por 30 min;
- 3) Incubar a 42°C por 1:30 min exatamente;
- 4) Rapidamente transferir para o gelo e incubou-se por 5 min;
- 5) Transferir a cultura para 3 ml de meio LB, em um tubo Falcon estéril de 25 ml;
- 6) Incubar o inoculo a 37°C, com agitação (100-150 rpm), por 50 min (A_{600} entre 0.5-1.0);
- 7) Plaquear 300 µl da suspensão de células em meio LB ágar contendo ampicilina (100 mg/l), 100 µl de IPTG (100 mM) e 20 µl de X-Gal (50 mg/ml)

- 8) Incubar a 37°C até o crescimento de colônias isoladas (*overnight*). Coletar algumas colônias transformadas para conferir a integridade do vetor transferido.

8.4. Produção de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

- 1) Inocular uma colônia isolada em 3 ml de meio LB contendo rifampicina (100 mg/l) e estreptomicina (50 mg/l);
- 2) Incubar o pré-inoculo a 28°C, com agitação (100-150 rpm), por 12 a 16 horas (A_{600} entre 0.5-1.0);
- 3) Transferir 2 ml da cultura para 50 ml de meio LB, em um Erlenmeyer estéril de 250 ml;
- 4) Incubar o inoculo a 28°C, com agitação (100-150 rpm), por 12 a 16 horas (A_{600} entre 0.5-1.0);
- 5) Transferir a cultura para um tubo e incubar no gelo por 15 min.
- 6) Centrifugar a 3000 rpm, por 15 min a 4°C;
- 7) Descartar o sobrenadante e delicadamente resuspender (com micropipeta) as células em 1 ml de CaCl_2 20 mM (mantido a 4°C);
- 8) Distribuir a suspensão de células em alíquotas de 100 μl , em tubos de microcentrífuga previamente resfriados.

8.5. Transformação do vetor binário em células competentes de *A. tumefaciens*

- 1) Adicionar aproximadamente 1 μg de DNA plasmidial por alíquota de 100 μl de células competentes e misturou-se delicadamente.
- 2) Incubar o tubo no gelo por 30 min;
- 3) Incubar as células em nitrogênio líquido até congelamento (cerca de 2 min);

- 4) Transferir imediatamente para 37°C e incubar por 5 min;
- 5) Adicionar 1 ml de meio LB, homogeneizar delicadamente com a micropipeta e incubar por 2 horas a 28°C;
- 6) Plaquear 150 µl da suspensão de células em meio LB ágar contendo rifampicina (100 mg/l), estreptomicina (50 mg/l) e canamicina (100 mg/l).
- 7) Incubar a 28°C até o crescimento de colônias isoladas (3 dias). Coletar algumas colônias transformadas para conferir a integridade do vetor transferido.

8.6. Extração de DNA de tabaco:

- 1) Macerar o tecido em nitrogênio líquido dentro de tubos de 1,5ml até transformar o mesmo em pó;
- 2) Adicionar 500 µl de tampão de extração;
- 3) Adicionar 35 µl de SDS 20%;
- 4) Incubar a 65°C 10 min;
- 5) Adicionar 130 µl de acetato de potássio 5M;
- 6) Incubar 5 min a 0°C;
- 7) Centrifugar a 15000g por 10 min;
- 8) Transferir o sobrenadante para um tubo de 2 ml contendo 640 µl de álcool isopropílico e 60 µl de acetato de sódio 3M;
- 9) Incubar a -20°C por 10 min;
- 10) Centrifugar a 15000 g por 15 min
- 11) Redissolver em 200 µl de Tris 50 mM pH 8 e EDTA 10mM pH 8;
- 12) Centrifugar a 15000 g por 5 min;
- 13) Transferir o sobrenadante para um tubo contendo 20 µl de acetato de sódio 3 M e 440 µl de etanol;

- 14) Incubar a -20°C por 10 min;
- 15) Lavar em etanol 70%;
- 16) Dissolver o sedimento em 50 µl de água.

Tampão de Extração:

100 mM Tris ph 8

50 mM Edta ph 8

500 mM Nacl

10 mM mercaptoethanol