

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RENATA LÚCIA GRUNENVALDT

CLONAGEM DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE *Eucalyptus grandis* E
VALIDAÇÃO EM *Nicotiana tabacum*



CURITIBA
2014

RENATA LÚCIA GRUNENVALDT

CLONAGEM DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE *Eucalyptus grandis* E
VALIDAÇÃO EM *Nicotiana tabacum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dr^a Marguerite G. G. Quoirin
Co-orientadoras: Dr^a Isabel Rodrigues Gerhardt
Dr^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA

2014

G891 Grunennvaldt, Renata Lúcia
Clonagem de promotores raiz-específicos de *Eucalyptus grandis* e validação em *Nicotiana tabacum*. / Renata Lúcia Grunennvaldt. Curitiba : 2014
55 f. il.

Orientador: Marguerite G. G. Quoirin

Co-orientadores: Isabel Rodrigues Gerhardt

Juliana Degenhardt-Goldbach

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia – Produção Vegetal.

1. Eucalipto – Melhoramento genético. 2. Genética florestal.
I. Quoirin, Marguerite G. G. II. Gerhardt, Isabel R. III. Goldbach,
Juliana D. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção
Vegetal. V. Título

CDU 631.523:582.776.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **RENATA LUCIA GRUNENVALDT**, sob o título "**CLONAGEM DE PROMOTORES RAIZ-ESPECIFICOS DE *Eucalyptus grandis* E VALIDAÇÃO EM *Nicotiana tabacum***", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2014.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Professor Dr. João Carlos Bespalhok Filho
Primeiro Examinador

Dra. Giovana Bomfim de Alcantara
Segunda Examinadora

Dra. Juliana Degenhardt-Goldbach
Terceira Examinadora

Professora Dra. Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Presidente da Banca e Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal por possibilitar a realização do mestrado.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Embrapa Florestas pelo espaço para a execução do trabalho.

À Professora Dr.^a Marguerite Quoirin pela oportunidade, orientação e por ser exemplo de profissionalismo.

À Comissão de Orientação, composta pela Dr.^a Isabel Gerhardt pela oportunidade e confiança a mim depositada para realização deste trabalho, a Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach pelo incentivo, amizade e palavras de ânimo.

À banca de defesa, composta pelo Dr. João Carlos Bernaldo Filho, Dr.^a Giovana Bomfim de Alcantara, Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach e Dr.^a Marguerite Quoirin.

À Marianne e a Daiane pela amizade e importante ajuda nas análises na Embrapa.

Ao Eduardo e todo pessoal da Bioquímica pela disposição em ajudar.

À minha amiga de coração Luciana Klein por toda força, palavras de motivação, pelas confidências, risos e por sempre estender seu ombro.

As amigas e colegas de laboratório Daniele, pelo auxílio nas análises moleculares e palavras de apoio, a Eliza por enxugar minhas lágrimas ao vermos que as bactérias não transformavam, a Cassi por toda grande ajuda, a Laudiane pela ajuda na cultura *in vitro* e a Yohana pelas palavras de apoio.

As amigas Caroline e Franciele pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais, fonte de toda minha persistência, pelo amor, carinho e confiança.

Meus irmãos Fernanda e Augusto pelo carinho e amor.

À turma de Agronomia da UFPR do primeiro período de 2010 pela amizade e momentos de descontração.

Ao meu namorado Angelo pelo amor, carinho, dedicação, palavras de motivação, por sempre estar ao meu lado deixando meus dias muito mais alegres.

À Deus pela vida e por sempre iluminar meu caminho.

A todos de que alguma forma não mediram esforços para me auxiliar durante esses dois anos de mestrado, meu muito obrigado!

CLONAGEM DE PROMOTORES RAIZ-ESPECÍFICOS DE *Eucalyptus grandis* E VALIDAÇÃO EM *Nicotiana tabacum*

RESUMO

O gênero *Eucalyptus* apresenta-se como um dos mais cultivados no mundo com uma ampla gama de utilizações, como matéria prima para fabricação de papel e celulose, móveis, estruturas para construção civil, carvão vegetal entre outras. A produção de plantas geneticamente modificadas com características específicas é um processo altamente promissor para o melhoramento genético das espécies de eucalipto. Pesquisas sobre o uso de promotores tecido-específicos são importantes, uma vez que esses direcionam a expressão de transgenes apenas nos órgãos/tecidos de interesse. Dessa forma, evitam a expressão generalizada em toda a planta, que, além do elevado custo energético, pode causar efeitos fenotípicos indesejáveis. O objetivo deste trabalho foi a clonagem de promotores raiz-específicos de *Eucalyptus grandis* e validação em *Nicotiana tabacum*, visando seu uso em construções gênicas para geração de plantas transgênicas tolerantes a estresses abióticos. Dois genes com expressão preferencial em raiz, *Eucgr.G02172* e *Eucgr.C00918*, foram selecionados a partir de uma biblioteca de cDNA de raiz, caule e folha de diferentes genótipos de *E. grandis* e 1 kb da região promotora foi amplificado a partir do DNA de folha. As regiões amplificadas foram purificadas e clonadas em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega). Após essa etapa, o plasmídeo foi digerido com enzimas de restrição *EcoRI* e *BglII* para liberar a região promotora, sendo essa posteriormente inserida no pCAMBIA 1303, vetor binário de transformação de planta que contém os genes marcadores *gus* e *gfp* fusionados. Os vetores contendo os promotores específicos de raiz foram utilizados para transformação de *N. tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* para validação da tecido-especificidade dos promotores isolados. Foi possível realizar a clonagem dos promotores específicos de raiz de *E. grandis* no vetor binário pCAMBIA 1303, permitindo que essa construção seja utilizada para transformação de outras espécies. Obteve-se eventos de *N. tabacum* transformados com promotor específico de raiz do gene *Eucgr.G02172* e análises histoquímicas indicaram a expressão do promotor isolado em tecidos vasculares de raízes e folhas de tabaco.

Palavras chaves: biologia molecular, espécie florestal, transformação genética.

CLONING OF ROOT-SPECIFIC PROMOTERS OF *Eucalyptus grandis* AND VALIDATION IN *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT

Eucalyptus genus is one of the most cultivated in the world with a wide range of uses such as feedstock for the manufacture of pulp and paper, furniture, structures for building construction, charcoal and others. The production of genetically modified plants with specific characteristics is highly promising for genetic breeding of these species. Researches about the use of tissue-specific promoters are important, since these direct the transgene expression only in the interested tissue or organ. Therefore, it avoids the generalized expression in the whole plant, which, besides the high energy cost, can cause undesirable phenotypic effects. The objective of this work was to clone root-specific eucalyptus promoters, seeking to use it in gene constructs to generate transgenic plants tolerant to abiotic stresses. Two genes with preferential expression in root, *Eucgr.G02172* and *Eucgr.C00918*, were selected from root, stem and leaves of a cDNA library of different genotypes of *E. grandis* and 1 kb of the promoter region was amplified from DNA leaf. The amplified regions were purified and cloned in pGEM-T Easy plasmid (Promega). After this step, the plasmid was digested with *EcoRI* and *BglII* to release the promoter region, and later inserted in the pCAMBIA 1303 binary vector containing the fused marker genes *gus* and *gfp*. The vectors containing the root-specific promoters were used for transformation of *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens* to validate the tissue-specificity of isolated promoters. It was possible to clone the root-specific promoters of *E. grandis* in the pCAMBIA 1303 binary vector, allowing the use of this construct for transformation of other species. Transformed events of *N. tabacum* with the root-specific promoter of the gene *Eucgr.G02172* were obtained and histochemical analyzes indicated the expression of the isolated promoter in vascular tissue of roots and leaves of tobacco.

Keywords: molecular biology, forest species, genetic transformation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Organização de um gene de eucarioto. 16
- Figura 2: Mapa do vetor pGEM T®-Easy28
- Figura 3: Mapa do pCAMBIA 1303, representando os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *BglII*.30
- Figura 4: Gel dos produtos do RT-PCR realizado com cDNA de folha, xilema e raiz de *Eucalyptus grandis*. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 kb). 1 a 3. Amplificação do gene *Eucgr.G02172* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. 4 a 6 e 10 a 12. Amplificação do gene *Eucons08* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. 7 a 9 Amplificação do gene *Eucgr.C00918* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. A flecha indica o fragmento de DNA amplificado no tecido da raiz.34
- Figura 5: Eletroforese dos produtos do PCR gradiente realizado com DNA de *Eucalyptus grandis*. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 kb). 1. Região promotora do gene *Eucgr.C00918*. 2. Região promotora do gene *Eucgr.G02172*. A flecha indica o fragmento de DNA referente à região promotora com 1kb do gene *Eucgr.G02172*.35
- Figura 6: Resultados da eletroforese em gel de agarose a 0,7% dos produtos da clivagem do vetor pGEM-T Easy com as enzimas de restrição *BglII* e *EcoRI*. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10Kb); 1. Promotor do gene *Eucgr.C00918*. 2. Promotor do gene *Eucgr.G02172*. As flechas indicam o fragmento de DNA referente ao vetor pGEM T Easy (3015 pb) e o fragmento referente aos promotores específicos de raiz (1000 pb).36
- Figura 7: Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da clivagem com as enzimas de restrição *BglII* e *EcoRI* no vetor pCAMBIA 1303. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10Kb); 1. Promotor do gene *Eucgr.C00918*. 2. Promotor do gene *Eucgr.G02172*. 3. pCAMBIA 1303 íntegro. As flechas indicam o fragmento de DNA referente ao vetor pCAMBIA 1303 linearizado pela clivagem com as enzimas (11542 pb), o resultado da clivagem do pCAMBIA transformado com o promotor (1000 pb) e o resultado da clivagem do pCAMBIA 1303 íntegro com a liberação do promotor constitutivo 35S (820 pb).37
- Figura 8: Confirmação da clonagem dos plasmídeos pCAMBIA 1303 íntegro e com os promotores específicos de raiz em *Agrobacterium tumefaciens*. Análise de eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 1%. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 Kb). 1. Região promotora do gene *Eucgr.C00918*. 2. Região promotora do gene *Eucgr.G02172*. 3. pCAMBIA 1303 íntegro amplificado com o gene *gus*. As flechas indicam o fragmento de DNA amplificado referente à região promotora específica de raiz (1000pb) e gene *gus* (400 pb).38
- Figura 9: Aspecto de explantes foliares de *Nicotiana tabacum*. (A) Explante iniciando a formação de calos após 40 dias do início da co-cultura com *Agrobacterium*

tumefaciens. (B) Explante inoculado contendo gemas após 40 dias do início da co-cultura. (C) Explante não inoculado iniciando a formação de gemas aos 20 dias de cultivo. (D) Explante regenerando brotos após 60 dias do início da co-cultura. Barra: 0,5cm.38

Figura 10: Expressão do gene *gus* em plântulas de tabaco transformadas com o pCAMBIA 1303 B21. A. Controle negativo. B. Controle positivo, plântula transformada com o pCAMBIA 1303 íntegro. C. Evento 2. D. Evento 3. E. Evento 4. F. Evento 9. G. Evento 11. H. Expressão do gene *gus* em raiz do evento 4. I. Expressão do gene *gus* em folha no evento 2. J. Expressão do gene *gus* em calo e folhas jovens no evento 4. Barra: 0,3 cm.40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA RT-PCR.....	26
TABELA 2: PCR GRADIENTE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA ESPECÍFICA DE RAIZ.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
ANA	Ácido naftaleno acético
CaMV 35S	Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
FPKM	Fragmentos por kilobase de exon por milhões de fragmentos mapeados no genoma
<i>gfp</i>	Gene que codifica a proteína verde fluorescente
<i>gus</i>	Gene codificante da enzima β - glucuronidase
INFTAB	Meio MS com vitaminas modificadas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio
Km	Canamicina
M	Molar
Mg	Magnésio
MS	Murashige e Skoog
NaCl	Cloreto de sódio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
ng	Nanogramas
p/v	Partes por volume
pb	Pares de base
pCAMBIA	Vetor binário de transformação de plantas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pGEM-T EASY	Vetor para clonagem de produtos de PCR
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
<i>Taq</i> polimerase	Polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	DNA de transferência
U	Unidade
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 IMPORTÂNCIA DO SETOR FLORESTAL NO BRASIL	13
2.2 O GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	13
2.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA	14
2.3 PROMOTORES	16
2.3.1 Promotores específicos	18
2.3.2 Promotores específicos de raiz	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS	22
3.2 MATERIAL VEGETAL	22
3.2.1 <i>Eucalyptus grandis</i>	22
3.2.2 <i>Nicotiana tabacum</i>	22
3.3 ESCOLHA DOS GENES PREFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RAIZ	23
3.4 DESENHO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS	24
3.5 EXTRAÇÃO DE RNA	25
3.6 SÍNTESE DE cDNA	25
3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO VIA RT PCR	25
3.8 EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.9 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA ESPECÍFICA DE RAIZ	27
3.10 CLONAGEM NO VETOR pGEM-T Easy	28
3.11 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO	29
3.12 TRANSFORMAÇÃO DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.13 TRANSFORMAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE TABACO VIA <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
3.14 AVALIAÇÃO DOS EXPLANTES REGENERADOS EM MEIO SELETIVO E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>gus</i>	33
4. RESULTADOS	34
4.1 ANÁLISE DE RT PCR DOS GENES SELECIONADOS	34
4.2 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO CONTENDO OS PROMOTORES ESPECÍFICOS DE RAIZ	35
4.3 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE <i>A. tumefaciens</i>	37
4.4 REGENERAÇÃO DE GEMAS EM EXPLANTES FOLIARES DE <i>Nicotiana tabacum</i> APÓS A INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA	38
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>gus</i> NAS PLANTAS TRANSFORMADAS	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	45
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	54

1 INTRODUÇÃO

Devido à plasticidade edafoclimática, rápido crescimento e alta produtividade, o eucalipto tornou-se um dos gêneros mais cultivados no mundo. O setor florestal brasileiro apresenta-se como um dos mais desenvolvidos e competitivos, detendo uma parcela significativa dos plantios globais. Conforme a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2013) em 2012, o cultivo desse gênero apresentava área total de 5.102.030 hectares em todo o Brasil, sendo que os estados com maior concentração de plantios florestais são Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Bahia, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul.

As espécies de eucalipto apresentam uma ampla gama de utilizações, devido às características físico-mecânicas, que permitem inúmeras utilizações como matéria-prima para produção de papel e celulose, marcenaria (serraria e madeira processada), caixotaria, estruturas para construção civil, dormentes, moirões, postes, lenha e carvão vegetal, indústria química e farmacêutica, como também na apicultura e ornamentação (GONZÁLES, 2002).

Uma das espécies de eucalipto mais cultivadas no Brasil é *Eucalyptus grandis*. Segundo Rocha (2000), a espécie apresenta boa adaptação na maioria das regiões do Brasil, com elevado potencial silvicultural e a forma das árvores favorece a produção de serrados e apresenta massa específica ideal para a produção de móveis. TOMASELLI (2000) ressalta que a madeira dessa espécie tem propriedades desejáveis para usos múltiplos, como massa específica média, grã direita, fácil usinagem, boa aceitação de acabamento e cor levemente avermelhada.

Tendo em vista essas características, relacionadas ao valor econômico, as pesquisas com essa espécie vêm aumentando consideravelmente. Desta forma, as técnicas da biotecnologia florestal, aliadas ao melhoramento convencional, podem contribuir para obtenção de genótipos com novas características de interesse em um menor espaço de tempo (GOLLE *et al.*, 2009).

A geração de árvores geneticamente modificadas representa uma ferramenta para alcançar características desejáveis em um programa de melhoramento florestal destacando a obtenção de plantas de crescimento mais rápido, que dão origem a madeiras com características mais adequadas ao beneficiamento industrial e menos

impactantes ao meio ambiente. Além disso, mediante dessa tecnologia é possível obter árvores mais tolerantes a diversos tipos de estresse, como a seca e o frio e mais resistentes a doenças e pragas.

A identificação e caracterização de promotores específicos de raiz torna-se uma ferramenta interessante para permitir a manipulação genética e explorar o potencial gênico do gênero *Eucalyptus*, uma vez que a maioria dos promotores estudados para esse gênero são promotores de genes envolvidos na via biossintética da lignina e possuem expressão em tecidos vasculares.

O objetivo geral deste estudo foi a clonagem de promotores específicos de raiz de *E. grandis* e posterior validação mediante a transformação genética de *Nicotiana tabacum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DO SETOR FLORESTAL NO BRASIL

A cadeia produtiva brasileira de base florestal associada às florestas plantadas caracteriza-se pela grande diversidade de produtos, compreendendo a produção, a colheita e o transporte de madeira, além da obtenção dos produtos finais nos segmentos industriais de papel e celulose, painéis de madeira industrializada, madeira processada mecanicamente, siderurgia, carvão vegetal e biomassa, entre outros. Em 2012, o valor bruto da produção obtido pelo setor totalizou 56,3 bilhões de reais, sendo que os tributos arrecadados corresponderam a 7,6 bilhões de reais (0,5% da arrecadação nacional) (ABRAF, 2013).

O Brasil tem condições favoráveis para a atividade florestal, dados os aspectos de clima e solo existentes, somando-se o fato de que a atividade encontra-se em franco crescimento, contribuindo sobremaneira em aspectos socioeconômicos, seja na geração de emprego e renda, bem como de divisas para a economia (MOREIRA, 2010).

Segundo a ABRAF (2012), no Brasil o segmento de Papel e Celulose derivado de *Eucalyptus* concentra 71,2% da área plantada, seguido pelos segmentos de siderurgia a carvão vegetal (18,4%), painéis de madeira industrializada (6,8%) e produtores independentes (3,6%).

2.2 O GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae*, é nativo da Austrália onde cobre 90% da área de florestas do país, formando densos maciços florestais nativos (SILVA, 2001). O Serviço Florestal da Austrália já identificou 670 espécies e apenas duas delas, *E. urophylla* e *E. deglupta* tem ocorrência natural fora do território australiano. Além do elevado número de espécies, existe um número muito grande de híbridos (SILVA, 2001). O gênero possui espécies adaptadas a diversas

condições de clima e solo, sendo as espécies *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. camaldulensis*, *E. saligna* e *E. tereticornis* as mais utilizadas para fins comerciais (MORA e GARCIA, 2000).

A expansão dos plantios de eucaliptos nos últimos anos tem suprido a crescente demanda de matéria-prima para a produção de papel e celulose, carvão vegetal, óleos essenciais, madeira sólida para serraria, postes de eletricidade, mourões de cerca e para construção civil entre outras. O setor privado vem demonstrando interesse pelo uso das florestas de eucalipto para a fixação de carbono, visando diminuir a concentração do dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (ALFENAS *et al.*, 2004).

Estima-se que 90 países usam este gênero em plantios comerciais, destacando-se a Índia, África do Sul, China, Itália, Israel, Argentina, Chile, países Árabes e o Brasil, principalmente destinados ao abastecimento do setor energético e para fins industriais (MOURA e GUIMARÃES, 2003).

Apesar de todo o conhecimento científico acumulado sobre esse gênero nos últimos anos, diversos pontos importantes ainda requerem investimentos em pesquisa e tecnologia. Ganha destaque no cenário atual a adoção de estratégias que permitam acelerar o melhoramento genético em um curto espaço de tempo, e a transformação genética tem se destacado nesse contexto (COSTA, 2011).

2.2 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE ESPÉCIES FLORESTAIS

Para as espécies florestais, o melhoramento genético associado com a transformação genética traz avanços visando à maior produtividade em condições adversas, como por exemplo, em solos pobres em nutrientes, salinos ou com déficit hídrico (VALDETARO *et al.*, 2011). Além disso, a transferência de genes para espécies do setor florestal contribui grandemente para minimizar as limitações do melhoramento, tais como o longo tempo para obtenção de novas gerações e a grande variabilidade existente entre e dentre espécies (DI CIERO e AMARAL, 2002).

Em geral, as espécies florestais nativas são bem adaptadas ao seu ambiente, exibindo alta competência ecológica. No entanto, plantações com espécies exóticas

revelam sua sensibilidade a diversos fatores ecológicos. Frio, seca, salinidade e toxicidade de metais pesados são os principais estresses que afetam especificamente árvores, que são submetidas a muitas mudanças anuais durante o seu ciclo de vida. A utilização da engenharia genética para tolerância ao frio permite que espécies sensíveis ao frio sejam plantadas em locais típicos de baixas temperaturas. A tolerância à seca e salinidade também é particularmente importante para reflorestamento em áreas áridas e semi-áridas para evitar perdas florestais e desertificação (CASTELLANOS-HERNANDEZ *et al*, 2011).

A transformação genética pode ser usada como ferramenta para melhorar a tolerância das culturas ao estresse. Segundo Ghanem *et al.* (2010), as características específicas de raiz como o arranjo estrutural do sistema radicular e seu rápido reconhecimento da falta de água e nutrientes, podem ser exploradas para melhorar a captação de recursos e o desenvolvimento da planta sob condições adversas. Estas respostas dadas pelas raízes podem ser manipuladas mediante uso de promotores específicos de raiz, para melhorar diretamente essas características e, portanto, o desempenho da planta.

A transformação genética implica na modificação do genoma de um organismo de forma intencional. Para isso, utilizam-se fragmentos de DNA exógenos com função conhecida, os quais são transferidos para um organismo alvo, que por sua vez poderá passar a produzir grandes quantidades de uma determinada substância, expressar, reprimir e/ou diminuir características desejadas (DI CIERO e AMARAL, 2002).

A transformação genética em vegetais só foi possível a partir do desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos vegetais. Para que o processo de transformação seja efetivo, o DNA exógeno deve ser introduzido na célula ou nos tecidos vegetais e uma planta transgênica deve ser regenerada a partir dessa célula transformada. Isso é possível devido ao fenômeno da totipotência, a capacidade que as células vegetais apresentam de se desenvolverem em novas plantas na presença de condições favoráveis de reguladores de crescimento e nutrientes (ZERBINI *et al.*, 2013).

Para que a transferência de genes ocorra com sucesso, três etapas fundamentais são necessárias: identificação, isolamento e introdução do gene de interesse no DNA da planta; identificação, seleção e crescimento das células

transformadas; e utilização de um sistema de regeneração das células transformadas (VALDETARO *et al.*, 2011).

As técnicas de transformação genética são divididas em duas categorias: o método indireto, usando como vetor intermediário a bactéria *Agrobacterium*, e os métodos diretos, os quais dispensam vetores intermediários (STUDART-GUIMARÃES, 2003). A transformação genética via *Agrobacterium* é amplamente utilizada, por ser bastante eficiente para dicotiledôneas e principalmente por ser uma metodologia fácil de ser aplicada e de baixo custo (BORÉM, 1998).

2.3 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 (Figura 1). Os fatores de transcrição, por sua vez, são ativados sob as mais diversas situações, tais como estímulos endógenos (auxinas, giberelinas, ácido salicílico, ácido jasmônico) e exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura). A ação combinatória do promotor e dos fatores de transcrição determina a ativação ou repressão da expressão gênica (STEPHEN e JAMES, 2003; BRANDALISE, 2007).

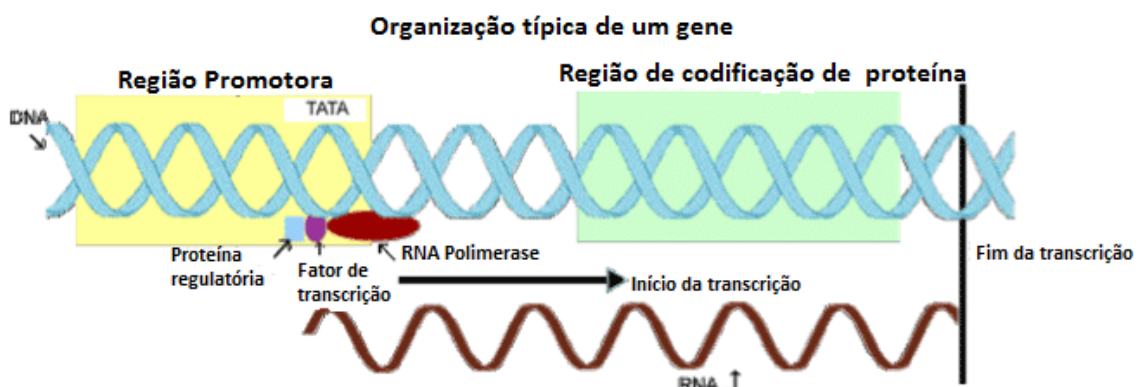


Figura 1: Organização de um gene de eucarioto.
Fonte: Roa-Rodrigues (2007).

Para a maioria dos genes que codificam proteínas, o início da transcrição inclui a ligação e ativação da RNA polimerase II (POTENZA *et al.*, 2004), sendo esta a etapa mais regulada da expressão gênica, fato este que reflete a porcentagem do genoma dedicada aos fatores de transcrição em plantas e em outros eucariotos. Essa etapa é controlada essencialmente pela região promotora do gene (SINGH, 1998). Em eucariotos a região promotora, em geral, possui uma sequência 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 (STEPHEN e JAMES, 2003).

Os processos que proporcionam a modulação transcricional são extremamente complexos; os elementos contidos nas sequências promotoras normalmente determinam o ponto correto de início da transcrição, atuando como ativadores ou repressores, indicando o local e o momento em que esse processo biológico deverá ocorrer (BUTLER e KADONAGA, 2002).

Os promotores constituem uma ferramenta chave em processos biotecnológicos a fim de garantir que a expressão de um gene de interesse seja efetiva e regulada (BRANDALISE, 2007). A disponibilidade de promotores que diferem na sua capacidade de regular os padrões de expressão temporal e espacial do transgene tende a aumentar a aplicação bem-sucedida de tecnologia transgênica. Ao longo dos anos, numerosos promotores foram isolados a partir de uma grande variedade de organismos e aplicados em sistemas de engenharia genética das plantas (POTENZA *et al.*, 2004).

O promotor em sua maior parte fará a regulação da expressão do transgene, uma vez que a transcrição é o primeiro processo de regulação gênica. Porém, a expressão do transgene não é uniforme em todas as plantas geradas sob as mesmas condições, pois ele está sujeito a mecanismos de regulação endógenos da planta. Essa variabilidade de expressão pode ser diminuída com a escolha de um promotor adequado para regular o transgene, melhorando a eficiência da técnica (BUTAYE *et al.*, 2005).

Os promotores podem ser classificados como constitutivos, órgãos ou tecido específicos e induzíveis. Um promotor constitutivo dirige a expressão de um gene em todos os tecidos de uma planta durante as várias fases de desenvolvimento. Um promotor tecido específico dirige a expressão do gene apenas em certos tecidos, e

pode ou não ser ativado durante todos os estágios de desenvolvimento. Um promotor induzível inicia a expressão do gene em resposta a agentes químicos, físicos ou estresses bióticos e abióticos (CARNEIRO e CARNEIRO, 2011).

Dentre os promotores comumente utilizados na produção de plantas geneticamente modificadas, destacam-se o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S), os promotores dos genes NOS, OCS, que codificam respectivamente a nopalina sintetase e a octopina sintetase, ambos de *Agrobacterium tumefaciens*, e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (Ubi-1) de milho (HOSHINO, 2007). De forma particular, o promotor CaMV 35S é valioso porque proporciona uma expressão elevada em todas as regiões da planta transformada e geralmente encontra-se disponível no cassete do vetor utilizado para transformação, o que facilita a subclonagem do transgene de interesse (POTENZA *et al*, 2004).

Promotores constitutivos como o CaMV 35S, quando associados, por exemplo, a genes de seleção de transformantes (tais como os que conferem resistência a antibióticos) determinam, em geral, a expressão do produto gênico em todos os tecidos da planta, e isso nem sempre é desejável e causa preocupação a respeito dos efeitos dos transgênicos no meio ambiente (HOSHINO, 2007; BRANDALISE, 2007).

A expressão constitutiva pode ser problemática por várias razões. Se um transgene é abundante, na hora errada, em tecidos em que não é normalmente expresso, ou em níveis muito elevados, pode ter consequências inesperadas no crescimento e desenvolvimento da planta e potencialmente para o meio ambiente. Desta forma, promotores de plantas que são ativados precisamente quando e onde são necessários tornam-se ideais para aplicações de engenharia genética (POTENZA *et al*, 2004).

2.3.1 Promotores específicos

A utilização de promotores órgão ou tecido específicos que induzem e controlam precisamente a expressão de transgenes no órgão e/ou tecido desejável

pode ser vantajosa para evitar um desperdício desnecessário de energia e dos nutrientes da planta transgênica quando a proteína de interesse não é necessária para toda a planta. Além disso, o uso destes promotores é útil, tanto no contexto científico como comercial e traz, entre outras vantagens, o aumento da biossegurança. Desta forma, o isolamento e a caracterização de promotores adequados para a engenharia genética de plantas é altamente desejável (DANIELL, 2002; POTENZA *et al.*, 2003, CARNEIRO e CARNEIRO, 2011).

Existem diversos promotores de origem viral, microbiana e vegetal capazes de dirigir a expressão órgão-específica em plantas; entretanto é desejável que esses promotores tenham origem na mesma espécie de planta ou em espécies filogeneticamente próximas, pois os sistemas regulatórios são únicos, podendo não agir da maneira prevista em espécies heterólogas distantes (TYAGI, 2001).

A escolha do promotor utilizado na construção de transgene depende fundamentalmente dos objetivos almejados após a transformação genética (POTENZA *et al.*, 2004). Promotores específicos podem dirigir a expressão de genes que conferem resistência a patógenos de maneira dirigida (TWYMAN, 2003a). No caso de toxinas para pragas, é possível limitar sua expressão somente ao órgão alvo desses organismos, impedindo a presença das toxinas no produto que será consumido pela população e também em outros órgãos que são utilizados na alimentação de animais, diminuindo, então, a probabilidade de que organismos não alvos sejam afetados (POTENZA *et al.*, 2004). Na produção de biofármacos, o uso de promotores órgão-específicos é importante para expressar o gene naqueles órgãos que são capazes de produzir a proteína de forma apropriada (TWYMAN *et al.*, 2003b).

2.3.2 Promotores específicos de raiz

Promotores específicos de raiz são de particular interesse, uma vez que são uma promessa para uma ampla variedade de aplicações. As proteínas recombinantes podem ser expressas no que é relacionado com o contato solo-raiz, incluindo a engenharia genética para biorremediação de contaminantes do solo,

proteção contra a seca, aumento da tolerância ao sal, captação de macro e micronutrientes, ou aumento da resistência aos agentes patogênicos radiculares (POTENZA *et al.*, 2004). Além disso, a expressão do transgene especificamente na raiz pode ser apropriada para a utilização de solos marginais (TWYMAN, 2003).

A raiz é o primeiro órgão da planta que sente as tensões como estresse iônico e osmótico decorrentes da seca, salinização do solo, acúmulo de metais pesados, deficiência de nutrientes e presença de microorganismos da rizosfera (JONES *et al.*, 2008). Ainda, o sistema radicular captura água e nutrientes, importantes para o desenvolvimento e rendimento das culturas; por isso, um foco biotecnológico tem se voltado ao estudo de promotores específicos de raiz e promotores induzíveis de raiz, uma vez que a superexpressão de proteínas localizadas em raízes é capaz de melhorar o crescimento ou a tolerância ao estresse das plantas (GHANEM *et al.*, 2010).

O promotor específico de raiz de tabaco: *TobRB7*, foi identificado por Yamamoto *et al.* (1991). A expressão do promotor *TobRB7* foi localizada no meristema radicular e regiões do cilindro central imaturo, levando a conclusão que o produto do gene é necessário para o desenvolvimento inicial do meristema radicular.

Em estudos com tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), Jones *et al.* (2008) isolaram um gene chamado de *SIREO*, com alta expressão em raízes e um nível muito baixo de expressão na parte aérea da planta. A atividade do promotor não foi afetada pelo estresse e pelos ferimentos, mas apresentou-se reduzida quando exposta ao ácido salicílico, NaCl e ácido jasmônico. O promotor do gene *SIREO* apresenta propriedades ideais para aplicações que requerem força e especificidade na expressão de genes na raiz de tomate e é presumível que seja útil em outras plantas cultivadas.

Objetivando identificar promotores capazes de dirigir a expressão de transgenes em órgãos/tecidos específicos de café, Severino *et al.* (2012) descreveram e caracterizaram o gene *CaPrx* de *Coffea arabica* que codifica uma peroxidase (enzima envolvida em uma variedade de processos fisiológicos e relacionada a estresse nas plantas). O gene *CaPrx* é especificamente expresso em raízes e em resposta a estresse biótico, sendo que responde à infecção por nematóides em estágios iniciais (SEVERINO *et al.*, 2012).

Entre as espécies florestais, poucos promotores com expressão tecido específica foram identificados e caracterizados funcionalmente. Em estudos com

Pinus monticola, Liu e Ekramoddoullah (2003) isolaram e caracterizaram o gene *PmPR10-1.14*, o qual codifica um polipeptídeo que exibe elevada similaridade com outros membros da família PR10. Este promotor direcionou a expressão em tecido de raiz em tabacos transformados, sendo que a expressão específica nesses tecidos ocorreu exclusivamente durante o início de desenvolvimento das raízes laterais. Promotores específicos de raiz, como o *PmPR10-1.14*, podem ser utilizados para promover a expressão de proteínas nas raízes, visando aumentar a resistência das plantas a patógenos, pragas, a tolerância ao calor, à salinidade ou seca.

Para a espécie *E. grandis*, Ribeiro (2009) validou o promotor denominado 5B que apresentou expressão específica em raiz. Para transformação de tabaco, o mesmo autor construiu um cassete de expressão contendo esse promotor em fusão transcricional ao gene *gus* inserido no vetor pCAMBIA-1381z. Em seguida, Costa (2011) caracterizou funcionalmente este promotor, previamente inserido em tabaco por Ribeiro (2009) e observou que o promotor 5B direciona a expressão do gene repórter *gus* em feixes vasculares não somente em raízes, mas também em folhas.

Os promotores mais estudados no caso do eucalipto são os promotores de genes envolvidos na via biossintética da lignina que possuem expressão específica em tecidos vasculares. Lauvergeat *et al.* (2002) estudaram o promotor do gene *EgCAD2* de *Eucalyptus gunnii* cuja possível utilização na composição de cassetes de expressão permite direcionar a expressão de transgenes em tecidos vasculares de plantas perenes (videira e álamo) e herbáceas (tabaco). Outro exemplo bem sucedido do uso de promotores específicos de tecidos vasculares de espécies do gênero *Eucalyptus* é o promotor *EgCCR* de *Eucalyptus gunnii*, que direcionou a expressão de transgenes em tecido vascular de videira (GAGO *et al.*, 2011). Tanto o promotor *EgCAD2* como o *EgCCR* podem representar uma aplicação importante que seria conduzir a expressão de genes de defesa a tecidos vasculares, a fim de aumentar a resistência contra os agentes patogênicos vasculares, sendo extremamente valiosos para plantas de interesse econômico em todo o mundo (LAUVERGEAT *et al.*, 2002; GAGO *et al.*, 2011).

Na literatura existem poucos registros de promotores que apresentam expressão direcionada a órgãos de eucalipto como folhas e raízes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DOS EXPERIMENTOS

As análises moleculares e os trabalhos de transformação genética foram conduzidos respectivamente no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Florestas – Colombo/PR e no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CQB 114/99).

3.2 MATERIAL VEGETAL

3.2.1 *Eucalyptus grandis*

Para as análises moleculares foram utilizados folhas, raízes e xilema da espécie *Eucalyptus grandis*. As árvores utilizadas para a coleta apresentavam dois anos de idade e encontravam-se localizadas na Embrapa Florestas, Colombo-PR. Para coleta de xilema foram realizados cortes de 30 x 20 cm possibilitando a retirada da casca, em seguida foi feita raspagem do xilema exposto. As folhas coletadas eram jovens e não apresentavam doenças ou injúrias. As raízes foram retiradas com auxílio de uma enxada, seguida de lavagem em água ultra pura para retirar o excesso de solo. Após a coleta, os tecidos foram colocados imediatamente no nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80°C.

3.2.2 *Nicotiana tabacum*

Para os experimentos de transformação genética foi utilizada a planta modelo *Nicotiana tabacum* (Wild Type - cv. Petit Havana SR-1). Sementes dessa espécie

foram cedidas pelo IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná) de Londrina/PR e passaram pelo processo de assepsia sendo imersas em etanol 70% com Tween-20® (3 gotas/100 mL), por 1 min, e após em NaOCl a 1% durante 20 min. Posteriormente as mesmas foram enxaguadas 3 vezes em água destilada autoclavada e inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,8.

A cada 30 dias, as plântulas foram subcultivadas para o mesmo meio visando à multiplicação das gemas axilares. Folhas de plantas micropropagadas no segundo subcultivo foram cortadas em círculos de aproximadamente 1 cm de diâmetro, os quais foram utilizados como explantes para a transformação genética. Utilizou-se folhas de diferentes tamanhos as quais foram inteiramente cortadas para utilizar como explante para a transformação.

As culturas *in vitro* foram mantidas em placas de Petri de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC. A cada 30 dias as brotações foram transferidas para frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com filme PVC, contendo aproximadamente 20 mL de meio de cultura. Todos os meios de cultura utilizados foram autoclavados durante 25 minutos a 120 °C. As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 mmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2°C.

3.3 ESCOLHA DOS GENES PREFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM RAIZ

Para isolamento de promotores capazes de direcionar a expressão do transgene em raiz, foram escolhidos genes-candidatos com expressão preferencial nesse tecido a partir de dados de RNA-Seq gerados de bibliotecas de raiz, caule e folha de plantas de três genótipos de eucalipto em trabalho prévio deste grupo (GERHARDT *et al.*, artigo em preparação). A análise da expressão diferencial de genes foi feita com o *software* Cuffdiff (TRAPNELL *et al.*, 2010).

A análise da expressão diferencial de genes revelou a existência de 751 genes expressos preferencialmente na raiz de todos os genótipos avaliados (Gerhardt *et al.*, artigo em preparação).

Para a escolha dos genes dos quais os promotores seriam isolados analisou-se os valores de FPKM (fragmentos por kilobase de exon por milhões de fragmentos mapeados no genoma) de cada gene. Geralmente, quanto maior o valor de FPKM, maior seu nível de expressão (MANTENIOTIS *et al.*, 2013). Os critérios de seleção para a escolha dos genes foram os níveis de expressão (estar entre os 20 mais expressos na raiz) e não ter função já descrita na literatura. Dois genes foram escolhidos para isolamento e clonagem: o *Eucgr.C00918* e o *Eucgr.G02172*. O gene *Eucgr.C00918* é um gene de função desconhecida, não tem homologia com nenhum outro gene entre as angiospermas, parecendo ser exclusivo de eucalipto, o que o torna um alvo biotecnológico interessante. O gene *Eucgr.G02172* é bem mais expresso que o *Eucgr.C00918*, aparecendo entre os 5, 6 mais expressos de raiz, dependendo do genótipo, também tem função desconhecida, apesar de apresentar um domínio proteico característico de proteínas que respondem a estresses, *Pathogenesis-related protein Bet v I family* (RADAUER *et al.*, 2008). Proteínas dessa família tem sua expressão induzida em situações de resposta à infecção por patógenos, ferimentos e estresses abióticos (KITAJIMA e SATO, 1999).

3. 4 DESENHO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados a partir de dados de genoma do eucalipto, disponíveis no banco público Phytozome (<http://www.phytozome.net>). Os *primers* utilizados do gene constitutivo, dos genes raiz-específicos selecionados e das regiões promotoras foram desenhados com auxílio do Programa IDT Primer Quest (<http://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>). Sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *EcoRI* e *BglII* foram adicionados à extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente, das regiões promotoras, para possibilitar a clonagem em vetor de expressão.

3.5 EXTRAÇÃO DE RNA

Com o objetivo de confirmar *in vivo*, via reação em cadeia da polimerase (PCR), a especificidade dos genes selecionados, realizou-se extração de RNA total de diferentes tecidos de *E. grandis* (folha, raiz e xilema) conforme Chang *et al.* (1993), método que usa CTAB no tampão de extração.

A quantificação do RNA extraído foi realizada em biofotômetro (Eppendorf). A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e 260 e 230 nm, utilizando-se água/DEPC para o ajuste inicial do aparelho. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) corado com brometo de etídio.

3.6 SÍNTESE DE cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA extraído de folha, raiz e xilema de *E. grandis* descrito anteriormente. Para tanto, se utilizou o Kit *SuperScript™ First-Strand (Invitrogen)*, tomando-se como base as instruções do fabricante.

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO VIA RT PCR

Estas reações tiveram como principal objetivo verificar a expressão gênica, uma vez que utilizou-se RNA de diferentes tecidos e converteu-se para cDNA (DNA complementar) fazendo uso dos *Primers* desenhados com base nos dois genes específicos de raiz. As sequências dos genes *Eucgr.G02172* e *Eucgr.C00918* foram

amplificadas utilizando-se respectivamente os seguintes *primers*: (5'-AGCTGAGCATCGAGTACGAGAAGT-3' e 5'-TGCGCTTGAAACGTGAGCATC-3'); (5'-ACGCGAAATCATCGACTGAGAGCA - 3' e 5'-TCTTTGTCTTCCTCGCCGGAGTTT - 3').

Foi utilizado um gene de referência para comparar a expressão com os genes específicos de raiz anteriormente descritos: o gene *Eucons08* caracterizado por Oliveira *et al.* (2012) como um dos mais adequados para a normalização dos estudos de expressão para o gênero *Eucalyptus*, uma vez que o gene *Eucons08* codifica o fator de transcrição de alongamento s-II (TFIIS). Para tal, a sequência do gene *Eucons08* foi amplificada utilizando-se os *primers* (5'-TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT- 3' e 5'-TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT - 3') que amplificam um fragmento de 171 pb.

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS) e realizadas utilizando o cDNA de raiz, folha e xilema, testando cada tecido com os *primers* dos dois genes selecionados e dos dois genes de referência. Para tal, utilizou-se: 1 µL de cDNA; 2,5 µL tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl₂ (50mM); 2,5 µL dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward e reverse* (10 µM cada); 1 µL *Taq* polimerase para um volume de 25 µL. As condições de amplificação estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1: CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DO RT-PCR

Estágio	Número de Ciclos	Etapa	Temperatura	Tempo
1	1	Desnaturação	94°C	5 min
2	30	Desnaturação	94°C	1 min
		Anelamento	60°C	1 min
		Extensão	72°C	2 min
		Extensão	72°C	7 min
3	1	Resfriamento	4°C	α

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), corado com brometo de etídeo.

3.8 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA genômico de folhas jovens de *E. grandis* foi realizada de acordo com Doyle e Doyle (1990). O conteúdo de DNA foi estimado em espectrofotômetro (A 260 nm) e a sua qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

3.9 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA ESPECÍFICA DE RAIZ

A partir do DNA genômico extraído de folhas de *E. grandis*, 1 kb da região promotora dos genes *Eucgr.G02172* e *Eucgr.C00918* foi amplificada através de PCR utilizando respectivamente os primers: *PROM G02172* (5'-GAATTCGCCTGACAACCGATGAGCCACCTA 3') e (5'-AGATCTACCATTCCCCCCTTTTTTCTGAGTGATAATTGTG 3'); *PROM C00918* (5'- GAATTCCAAATAAAGCGAGAACAATGTCGATGCGCT – 3' e 5'-AGATCTACCATGAAAGCTTCTCCGGGAGTCCTATCCTGTC – 3') e as reações foram realizadas conforme descrito anteriormente (3.7).

Realizou-se PCR Gradiente, buscando obter a melhor temperatura de anelamento para minimizar o número de bandas inespecíficas, segundo as condições descritas na Tabela 2.

TABELA 2: PCR GRADIENTE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA ESPECÍFICA DE RAIZ.

Estágio	Número de Ciclos	Etapa	Temperatura	Tempo
1	1	Desnaturação	94°C	5 min
		Desnaturação	94°C	1 min
2	35	Anelamento	55°C	1 min
			57°C	
			62°C	
3	1	Extensão	72°C	2 min
		Extensão	72°C	7 min
		Resfriamento	4°C	α

Os produtos de amplificação foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídeo e a reação que resultou na amplificação com o menor número de bandas inespecíficas para ambos os genes foi purificada com *QIAquick PCR purification kit protocol* (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

3.10 CLONAGEM NO VETOR pGEM-T Easy

Os produtos das reações de PCR purificados foram ligados ao vetor pGEM T®-Easy (Promega) (Figura 2). Alíquotas de aproximadamente 150 ng de DNA foram dispostas em microtubo de 1 mL juntamente com 50% de tampão de ligação 2x, 50 ng de vetor e 5 U de T4 DNA ligase. A reação de ligação permaneceu por uma hora e 30 min à 22°C.

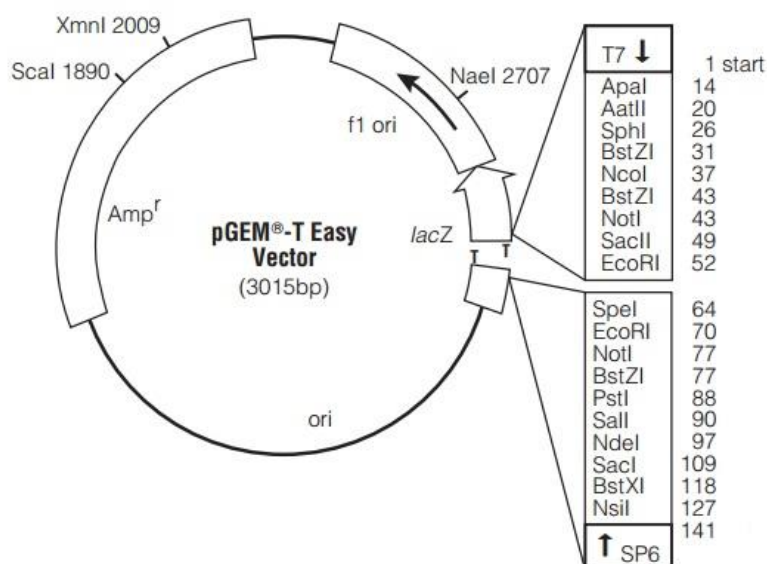


Figura 2: Mapa do vetor pGEM T®-Easy
Fonte: Promega

Células de *Escherichia coli* DH5- α quimiocompetentes (*Invitrogen*) foram transformadas por choque térmico conforme recomendações do fabricante. A 50 μ L

de células quimiocompetentes foram adicionados 5 μL da reação de ligação e esta mistura foi incubada em gelo por 30 min, seguido de incubação a 42 °C por 30 s e novamente gelo por 2 min. Para a recuperação das células, foram adicionados 900 μL de meio SOC e a cultura foi incubada a 37 °C por uma hora a 225 rpm. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1 mg de X-Gal e 10 mM de IPTG. As placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 h.

Para a análise dos transformantes, as colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 37 °C durante 16 h sob agitação. Após o crescimento, o DNA plasmidial foi extraído com o auxílio do kit Wizard®*Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A clonagem foi confirmada clivando as amostras de DNA plasmidial com enzimas de restrição *EcoRI* e *BgII* (Thermo Scientific).

A clivagem inicial foi realizada com 400 ng de DNA plasmidial, 20 U da enzima *BgII* e tampão de clivagem (buffer O) por 2 h a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 30 U da enzima *EcoRI* e a reação foi novamente incubada a 37 °C por 2 h. O resultado da clivagem foi visualizado em gel de agarose 0,7% (p/v). O fragmento referente à região promotora específica de raiz foi liberado do vetor pGEM modificado mediante essa clivagem, posteriormente foi retirado do gel de agarose 0,7% (p/v) com o auxílio de uma lâmina de bisturi e purificado com auxílio do kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN).

A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) e a quantificação do DNA foi realizada em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.11 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO

O vetor pCAMBIA 1303 é um vetor binário de transformação de plantas e apresenta em sua construção os genes repórter *gus* e *gfp*, sob o controle do promotor constitutivo 35S e o gene seletivo para plantas *hptII* que confere resistência a higromicina. O promotor constitutivo 35S foi substituído pelo promotor

específico de raiz, o qual foi inserido entre os sítios de restrição das enzimas *Bgl*II e *Eco*RI (Figura 3).

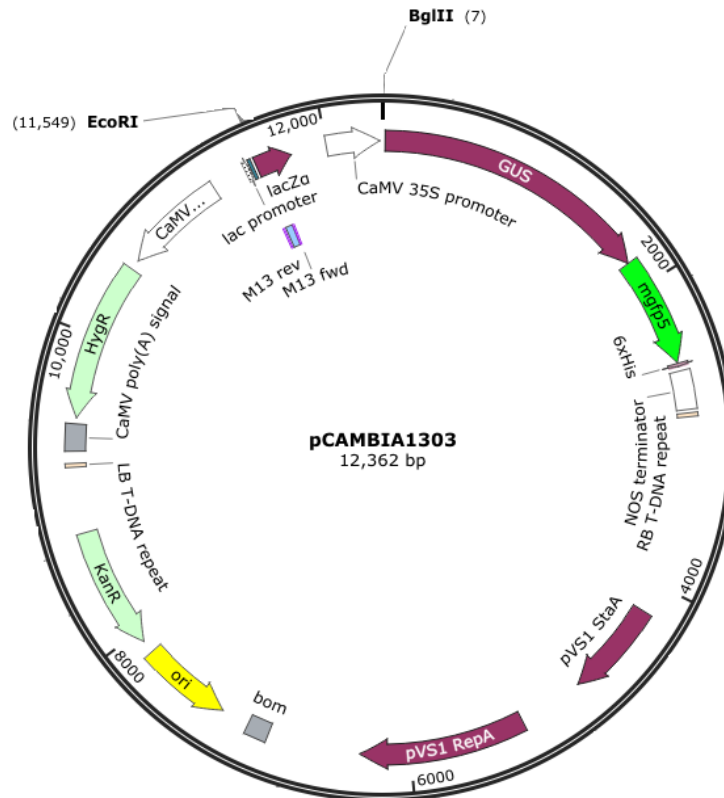


Figura 3: Mapa do pCAMBIA 1303, representando os sítios de restrição das enzimas *Eco*RI e *Bgl*II. Fonte: Snapgene.

Alíquotas de aproximadamente 400 ng de pCAMBIA 1303 foram digeridas com 30 U da enzima *Eco*RI e 20 U da *Bgl*II a 37 °C durante 3 h. Um fragmento de 11542 pb foi isolado do gel de agarose 0,7% (p/v) e purificado utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN).

A integridade e a concentração do DNA foram verificadas, respectivamente, em gel de agarose 1% (p/v) e em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

As ligações de cada um dos promotores ao vetor pCAMBIA 1303 foram realizadas na proporção de 3:1 (inserto: vetor), utilizando 50% de tampão de ligação 2x, 5 U de T4 DNA ligase (PROMEGA). A ligação permaneceu a 14°C *overnight* e o produto da ligação foi posteriormente utilizado para transformação de células de *E. coli* quimiocompetentes, cepa DH5α. As transformações foram realizadas por choque térmico, conforme descrito acima (3.10), plaqueadas em meio LB seletivo contendo 50 µg mL⁻¹ do antibiótico canamicina e colocadas para crescer em estufa a 37 °C durante 18 h.

Para a análise dos transformantes ambos promotores tiveram colônias isoladas e inoculadas em meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina e incubadas a 37 °C durante 16 h sob agitação. Após o crescimento, o DNA plasmidial foi extraído com o auxílio do kit Wizard®*Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

A clonagem foi confirmada clivando as amostras de DNA plasmidial com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Eco*RI e os vetores contendo os promotores específicos de raiz foram renomeados. O vetor pCAMBIA 1303 clonado com o promotor do gene *Eucgr.C00918* foi renomeado pCAMBIA 1303 A09; semelhantemente, o vetor pCAMBIA 1303 clonado com o promotor do gene *Eucgr.G02172* foi renomeado pCAMBIA 1303 B21.

3.12 TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens*

A linhagem desarmada de *A. tumefaciens* EHA105 (HOOD *et al.*, 1993) foi transformada pelo método de eletroporação e foram inseridos os plasmídeos pCAMBIA 1303, pCAMBIA 1303 A09 e pCAMBIA 1303 B21. *A. tumefaciens* foi transformada com o vetor pCAMBIA 1303 íntegro para posteriormente ser utilizado como controle positivo nas transformações de *Nicotiana tabacum*.

O procedimento da transformação de *A. tumefaciens* foi realizado igualmente para cada vetor. Para isso, 150 ng de plasmídeo foram homogeneizadas com 40 μL de suspensão bacteriana previamente armazenada a -80 °C em glicerol 10%. Essa mistura foi submetida à eletroporação em cubetas de 1 mm conservadas em gelo até o momento da emissão do pulso. A eletroporação foi realizada a 25000 V em aparelho Eporator® (Eppendorf). Em seguida, as células foram recuperadas em 500 μL de LB líquido. O material foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e manteve-se a 28 °C por uma hora sob agitação (225 rpm) e, após, plaqueou-se em meio LB sólido contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina para seleção das bactérias transformadas. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 2 dias.

As colônias de bactérias que se multiplicaram no meio de seleção foram incubadas em 4 mL de meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina por 24 h

a 28°C, a 130 rpm. Realizou-se a extração do DNA plasmidial com o auxílio do kit Wizard®*Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A transformação foi confirmada por PCR utilizando os *primers* descritos no item 3.9 para o pCAMBIA 1303 A09 e pCAMBIA B21. Para o pCAMBIA 1303 utilizou-se *primers* específicos para o gene *gus* (*primers*: 5'CAGCGCGAAGTCTTTATATACCG3' e 5'ATGCGTCACCACGGTGATATCG3') os quais amplificam um fragmento de 400 pb. Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v).

As colônias transformadas foram cultivadas em meio de cultura LB líquido suplementadas com 50 µg mL⁻¹ de canamicina e posteriormente armazenadas em glicerol 10% a -80 °C.

3.13 TRANSFORMAÇÃO DE EXPLANTES FOLIARES DE TABACO VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformação de *N. tabacum* via *A. tumefaciens*, foram utilizados 300 explantes para o vetor pCAMBIA 1303 B21, 125 explantes para o vetor pCAMBIA 1303 A09, 150 explantes para pCAMBIA 1303 íntegro e 75 explantes para o controle não inoculado no total de 3 transformações para cada vetor.

Da suspensão bacteriana armazenada a -80°C em glicerol (10%) retirou-se 40 µL e adicionou-se em 25 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg mL⁻¹ de canamicina a 28°C por 24 h sob agitação. A densidade ótica da suspensão bacteriana foi determinada por leitura em espectrofotômetro e monitorada até a obtenção de DO_{600nm} = 0,5 a 1.

A solução bacteriana foi pipetada para microtubo de 2 mL estéril e centrifugada a 5.000 rpm por 10 min; posteriormente o pellet foi ressuspenso em 1 mL de meio MS/2 líquido (com a metade da concentração dos sais do MS).

Inoculou-se os explantes foliares em placas de Petri contendo 200 µL da suspensão bacteriana e 20 mL de meio INFTAB líquido (BRASILEIRO, 1998), composto pelos sais do MS, 100 mg L⁻¹ de mio inositol, 1 mg L⁻¹ de pantotenato de cálcio, 1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 1 mg L⁻¹ de piridoxina, 1 mg L⁻¹ de tiamina e 0,01 mg L⁻¹ de biotina.

Os explantes permaneceram em co-cultura líquida por 48 h no escuro, sendo posteriormente lavados em INFTAB líquido por duas vezes e inoculados com a face adaxial em contato com o meio INFTAB sólido, acrescido de 1 mg L⁻¹ de BAP, 250 mg L⁻¹ de cefotaxima e 30 mg L⁻¹ de higromicina. Após 15 dias, os explantes foram transferidos para mesmo meio de cultura com metade da concentração de cefotaxima e mantidos por 15 dias. Após a regeneração dos explantes em brotos de aproximadamente 1 cm, os mesmos foram transferidos para meio MS e mantidos até atingir aproximadamente 2 cm, sendo então transferidos para o meio de enraizamento, MS suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) e 30 mg L⁻¹ de higromicina.

3.14 AVALIAÇÃO DOS EXPLANTES REGENERADOS EM MEIO SELETIVO E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *gus*

Aos 60 dias da inoculação foi avaliada a quantidade de explantes regenerando brotos por tratamento e o número de brotos por explante.

A avaliação da expressão do gene *gus* foi realizada por meio da reação histoquímica catalisada pela enzima β -glucuronidase na presença do tampão X-gluc (JEFFERSON, 1987). Posteriormente adicionou-se etanol 70% visando retirar a clorofila das plântulas e verificar melhor as manchas azuis.

A determinação da expressão do gene *gus* foi visual considerando-se *gus* positivo o tecido que apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul. A análise da expressão foi realizada após 90 dias da inoculação do tecido com a bactéria, e utilizou-se uma lupa Zeiss Stemi SV6 com aumento de 8 vezes para visualizar melhor a expressão do gene *gus* nos tecidos das plantas transformadas.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE RT PCR DOS GENES SELECIONADOS

Para confirmar a tecido especificidade dos genes selecionados, realizou-se RT-PCR com os tecidos da folha, xilema e raiz em comparação com o gene de referência *Eucons08*. O resultado observado confirmou a tecido especificidade do gene *Eucgr.G02172* e do gene *Eucgr.C00918* (Figura 4) os quais amplificaram somente no tecido da raiz.

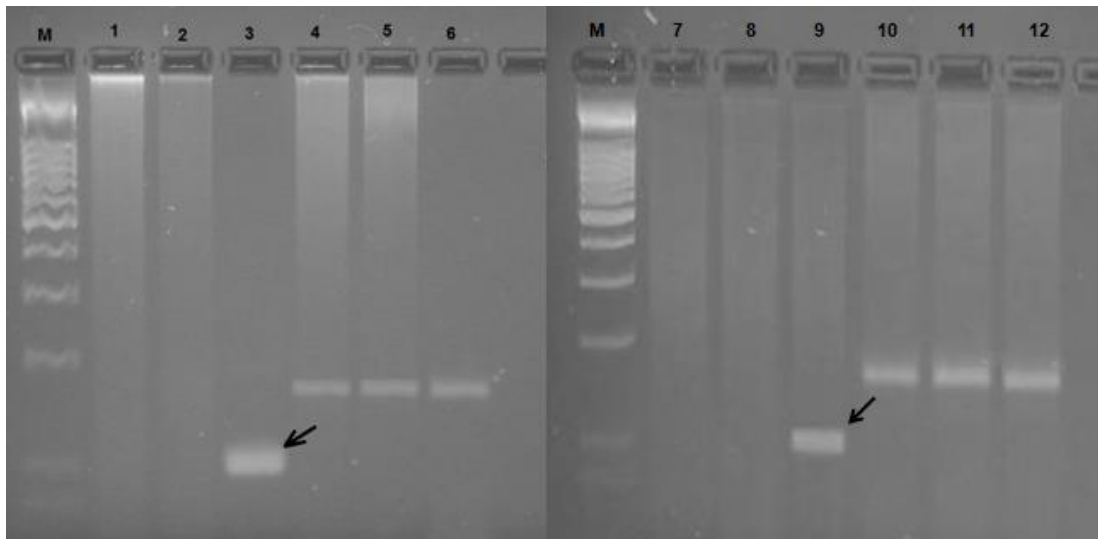


Figura 4: Gel dos produtos do RT-PCR realizado com cDNA de folha, xilema e raiz de *Eucalyptus grandis*. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 kb). 1 a 3. Amplificação do gene *Eucgr.G02172* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. 4 a 6 e 10 a 12. Amplificação do gene *Eucons08* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. 7 a 9 Amplificação do gene *Eucgr.C00918* no tecido de folha, xilema e raiz respectivamente. A flecha indica o fragmento de DNA amplificado no tecido da raiz.

O gene de referência amplificou em todos os tecidos mostrando ser eficiente como normalizador para o gênero *Eucalyptus*.

4.2 CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO CONTENDO OS PROMOTORES ESPECÍFICOS DE RAIZ

De acordo com a Figura 5, observa-se que a melhor temperatura de anelamento foi a de 62°C para o promotor do gene *Eucgr.C00918*. Entretanto, para o gene *Eucgr.G02172* a amplificação da região promotora com menor produção de bandas inespecíficas ocorreu em todas as temperaturas de anelamento testadas.

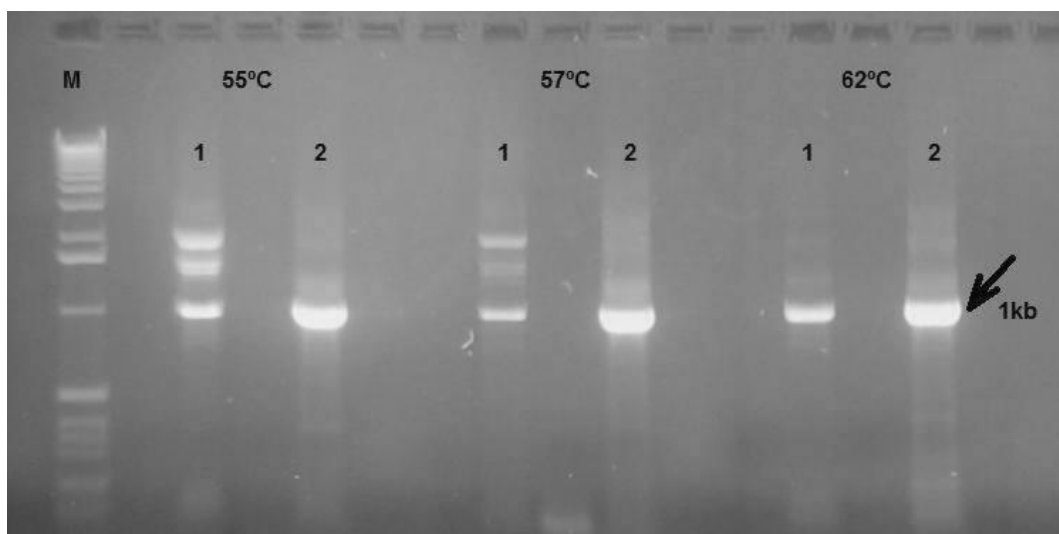


Figura 5: Eletroforese dos produtos do PCR gradiente realizado com DNA de *Eucalyptus grandis*. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 kb). 1. Região promotora do gene *Eucgr.C00918*. 2. Região promotora do gene *Eucgr.G02172*. A flecha indica o fragmento de DNA referente à região promotora com 1kb do gene *Eucgr.G02172*.

A clonagem do fragmento referente à região promotora dos dois genes de estudo no vetor pGEM T Easy foi confirmada por clivagem com as enzimas de restrição *BglIII* e *EcoRI* (Figura 6). O vetor pGEM T Easy apresenta um tamanho inicial de 3015 pb. Os promotores específicos de raiz com o tamanho de 1000 pb foram retirados do vetor e purificados.

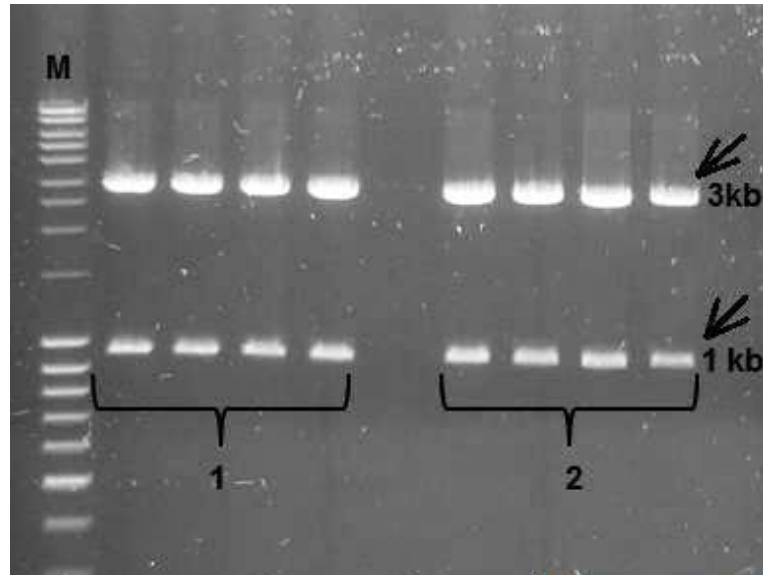


Figura 6: Resultados da eletroforese em gel de agarose a 0,7% dos produtos da clivagem do vetor pGEM-T Easy com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Eco*RI. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10Kb); 1. Promotor do gene *Eucgr.C00918*. 2. Promotor do gene *Eucgr.G02172*. As flechas indicam o fragmento de DNA referente ao vetor pGEM T Easy (3015 pb) e o fragmento referente aos promotores específicos de raiz (1000 pb).

O vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA 1303 foi igualmente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O vetor que apresenta um tamanho inicial de 12362 pb, ao ser clivado por essas enzimas, libera um fragmento de 820 pb correspondente ao promotor constitutivo 35S (Figura 7, 3). O produto dessa digestão resulta em um fragmento linearizado de 11542 pb.

O inserto (1000 pb) liberado pela digestão do vetor pGEM T Easy (figura 6) foi inserido por ligação ao vetor binário (11542 pb) o que permite a fusão do promotor específico de raiz a região *gusA-mgfp5*. O produto da ligação com um total de 12542 pb foi utilizado para transformação de *E. coli* e as colônias transformadas foram selecionadas em LB sólido contendo canamicina como agente seletivo (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A transformação das colônias e a clonagem foram confirmadas pela digestão com as mesmas enzimas de digestão utilizadas nas clivagens anteriores (Figura 7).

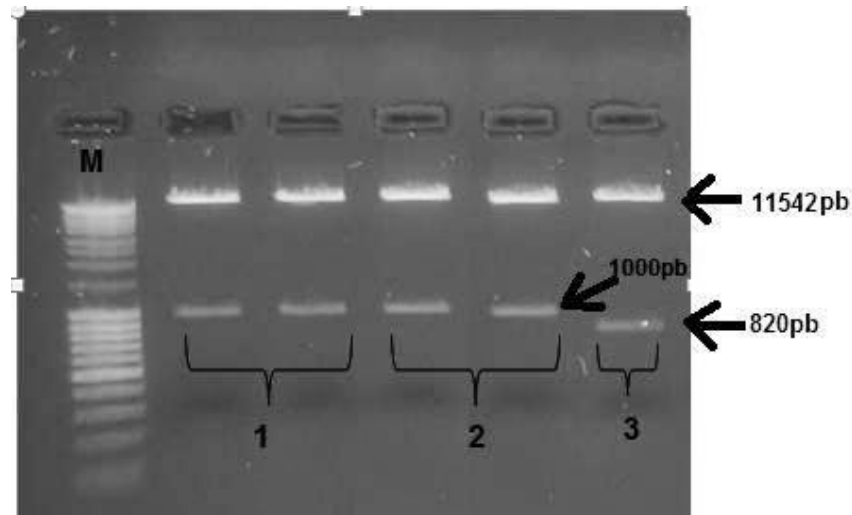


Figura 7: Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da clivagem com as enzimas de restrição *Bgl*I e *Eco*RI no vetor pCAMBIA 1303. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10Kb); 1. Promotor do gene *Eucgr.C00918*. 2. Promotor do gene *Eucgr.G02172*. 3. pCAMBIA 1303 íntegro. As flechas indicam o fragmento de DNA referente ao vetor pCAMBIA 1303 linearizado pela clivagem com as enzimas (11542 pb), o resultado da clivagem do pCAMBIA transformado com o promotor (1000 pb) e o resultado da clivagem do pCAMBIA 1303 íntegro com a liberação do promotor constitutivo 35S (820 pb).

Foi possível realizar a clonagem dos dois promotores específicos de raiz estudados no vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA 1303.

4.3 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE *A. tumefaciens*

A transformação de *A. tumefaciens* foi confirmada por PCR após o isolamento do plasmídeo (Figura 8), sendo que houve a amplificação da região promotora de ambos os promotores e também do gene *gus*.

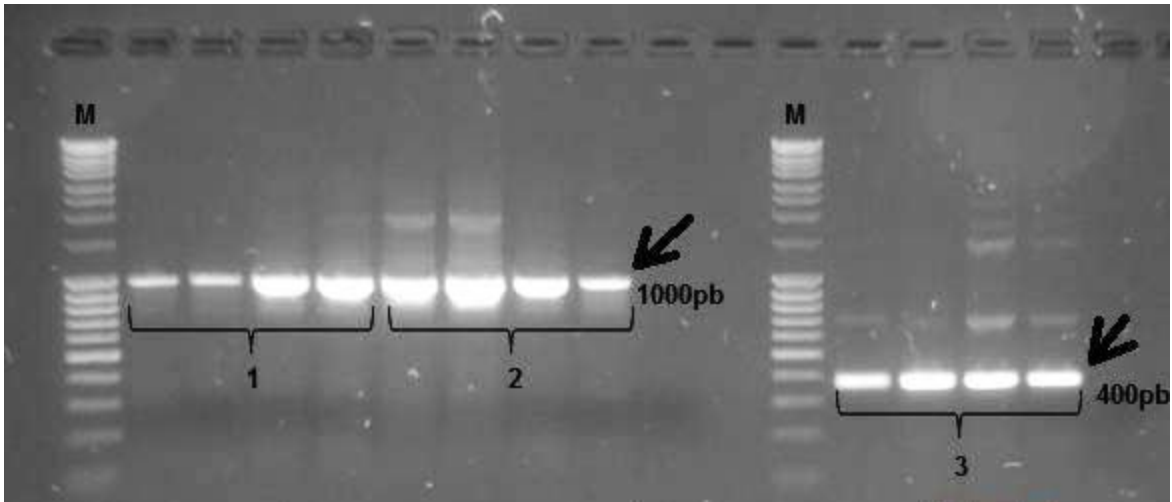


Figura 8: Confirmação da clonagem dos plasmídeos pCAMBIA 1303 íntegro e com os promotores específicos de raiz em *Agrobacterium tumefaciens*. Análise de eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 1%. M. Marcador de peso molecular (Ladder 10 Kb). 1. Região promotora do gene *Eucgr.C00918*. 2. Região promotora do gene *Eucgr.G02172*. 3. pCAMBIA 1303 íntegro amplificado com o gene *gus*. As flechas indicam o fragmento de DNA amplificado referente à região promotora específica de raiz (1000pb) e gene *gus* (400 pb).

4.4 REGENERAÇÃO DE GEMAS EM EXPLANTES FOLIARES DE *Nicotiana tabacum* APÓS A INOCULAÇÃO COM A BACTÉRIA

Após 40 dias do início da etapa de transformação, os explantes transformados iniciaram o processo de formação de calos e posteriormente formação de gemas. Os calos eram pequenos e surgiam em torno do explante (Figura 9B) e, em alguns casos, no centro, mesmo após o explante estar aparentemente morto (9A). Nos explantes controle, os calos começaram a surgir aos 15 dias em torno e no centro do explante em quantidade muito maior quando comparado aos explantes transformados (9C).

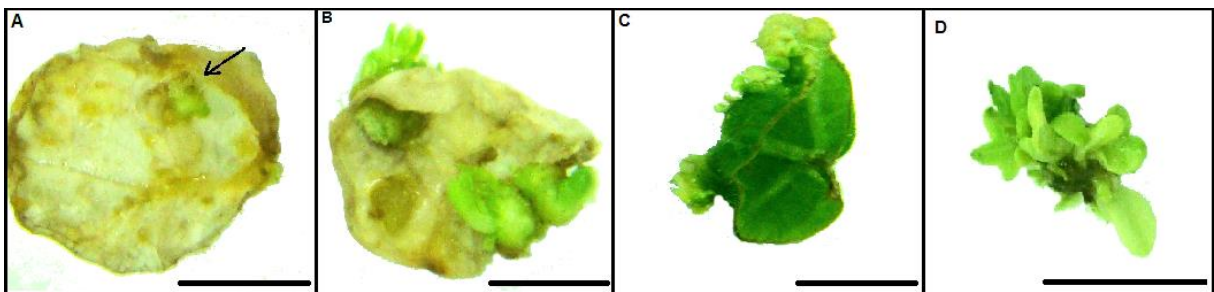


Figura 9: Aspecto de explantes foliares de *Nicotiana tabacum*. (A) Explante iniciando a formação de calos após 40 dias do início da co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*. (B) Explante inoculado contendo gemas após 40 dias do início da co-cultura. (C) Explante não inoculado iniciando a formação de gemas aos 20 dias de cultivo. (D) Explante regenerando brotos após 60 dias do início da co-cultura. Barra: 0,5cm.

Após 60 dias foram avaliados os explantes cultivados no meio contendo o agente seletivo higromicina (Figura 9D). Para o vetor pCAMBIA 1303 B21, de 300 explantes inoculados, 25 regeneraram em meio contendo agente seletivo. Para o pCAMBIA 1303 íntegro, dos 125 explantes inoculados apenas um regenerou, enquanto que para o pCAMBIA 1303 A09, de 150 explantes inoculados nenhum regenerou no meio de seleção.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *gus* NAS PLANTAS TRANSFORMADAS

Após 90 dias de co-cultura líquida com a solução bacteriana, o número de explantes regenerados em meio contendo agente seletivo passou de 25 para 17 explantes. Do total de 17 explantes foi possível realizar análise histoquímica de 8 que já apresentavam raízes formadas.

Como controle negativo, uma plântula não transformada foi submetida à análise histoquímica revelando a não expressão do gene *gus* (Figura 10 A).

Para o pCAMBIA 1303 íntegro, a expressão do gene *gus* não foi a esperada, uma vez que a expressão não foi constitutiva, ocorrendo somente em algumas partes da planta como folhas e calos (Figura 10 B).

A expressão do gene *gus* ocorreu em 5 eventos de *N. tabacum* transformados com o pCAMBIA 1303 B21, denominados eventos 2, 3, 4, 9 e 11 (Figura 10 C, D, E, F e G respectivamente). Essa expressão ocorreu nos feixes vasculares de raízes (Figura 10 H), porém não foi constatada em regiões meristemáticas de raízes. Observou-se também a expressão do gene *gus* em feixes vasculares de folhas menores de tabaco, sendo que a expressão estava basicamente restrita a região da nervura central de forma mais marcante e na nervura secundária de maneira menos acentuada (Figura 10 I). Entretanto, em folhas maiores a expressão do gene *gus* apresentou-se mais dispersa no limbo (Figura 10 E e G).

Na maioria dos eventos foi observada a expressão do gene *gus* em calos (Figura 10 D, G e J), entretanto, não se observou expressão no pecíolo foliar.

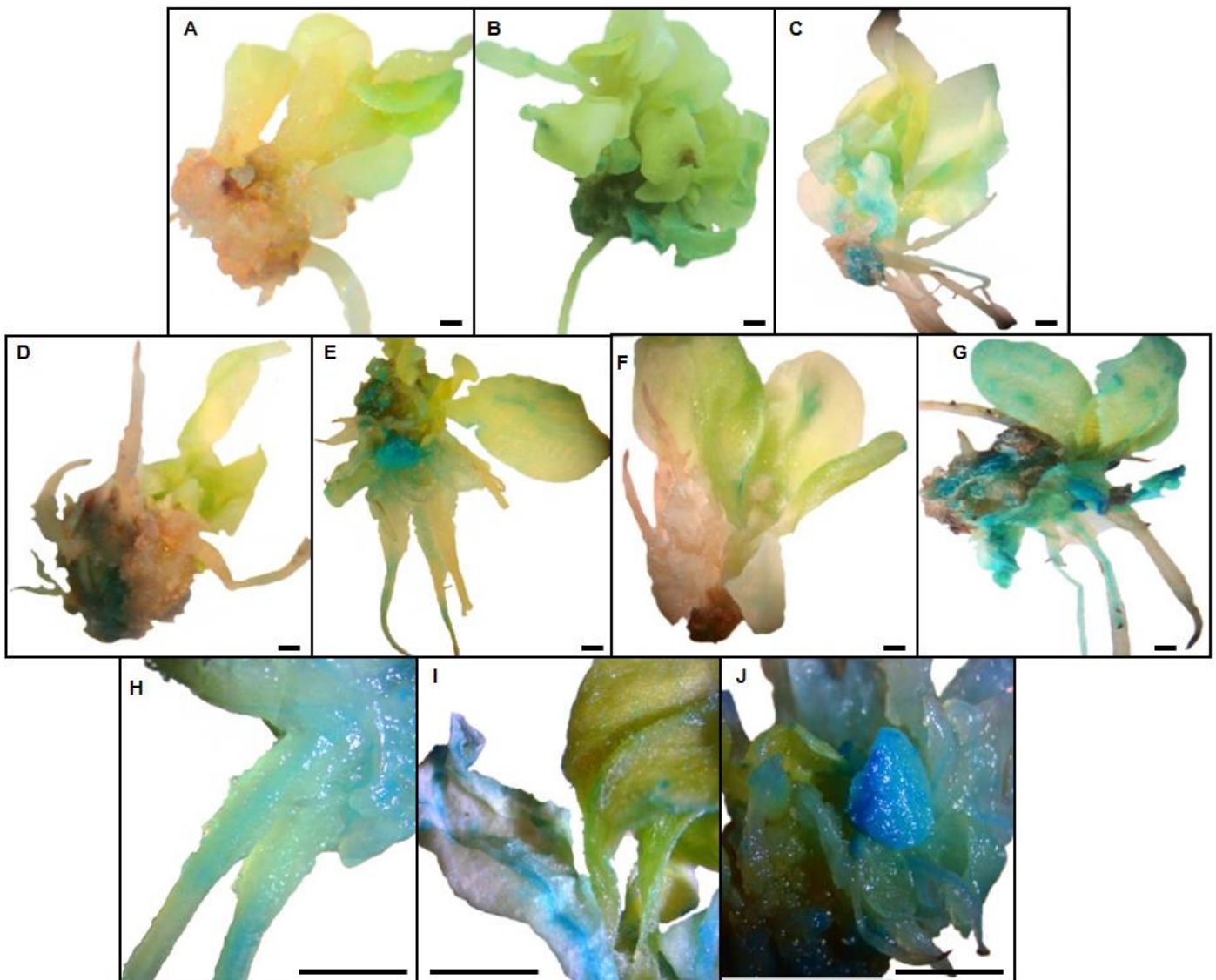


Figura 10: Expressão do gene *gus* em plântulas de tabaco transformadas com o pCAMBIA 1303 B21. A. Controle negativo. B. Controle positivo, plântula transformada com o pCAMBIA 1303 íntegro. C. Evento 2. D. Evento 3. E. Evento 4. F. Evento 9. G. Evento 11. H. Expressão do gene *gus* em raiz do evento 4. I. Expressão do gene *gus* em folha no evento 2. J. Expressão do gene *gus* em calo e folhas jovens no evento 4. Barra: 0,3 cm.

5 DISCUSSÃO

Um dos promotores mais utilizados no desenvolvimento de plantas transgênicas é o promotor constitutivo 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Entretanto, o uso dos promotores constitutivos causa a expressão desnecessária do gene, aumentando a possibilidade de interferência em outras rotas do desenvolvimento da planta (PAOLI *et al*, 2007). Algumas consequências negativas do uso de promotores constitutivos já foram observadas, destacando principalmente as alterações fenotípicas em plantas transformadas (MATSUHARA *et al.*, 2000).

Em estudo com *Solanum tuberosum* foi verificado que as plantas transformadas com o gene *cbf* isolado de *Arabidopsis* sob controle do promotor constitutivo CaMV35S e do promotor estresse induzido *rd29A*, apresentaram diferenças. Foi verificado o mesmo nível de tolerância ao frio nos dois tipos de plantas contendo o primeiro ou o segundo promotor, quando expostas a poucas horas de frio. Entretanto, nas plantas contendo o gene regulado pelo promotor constitutivo, as folhas apresentaram tamanho reduzido, ocorreu atraso no florescimento e redução e/ou falta de produção do tubérculo (PINO *et al*, 2007). ZUO *et al.* (2002) observaram em *Arabidopsis*, que plantas com expressão constitutiva de genes *lec1* "Leafy cotyledon", que codificam uma subunidade do complexo do fator transcricional atuando no processo de embriogênese somática, tinham crescimento e desenvolvimento anormal e formação ocasional de estruturas semelhantes a embriões somáticos.

Diante disso, o uso de promotores órgão/tecido específicos e induzidos sob condições características, que confirmam a expressão dos genes em locais, tempo e intensidade específicos será pré-requisito em gerações futuras de transgênicos (PAOLI, 2007).

Nesse estudo utilizou-se o vetor pCAMBIA1303 para testar promotores específicos de raiz; esse vetor foi utilizado com a mesma finalidade por Carneiro *et al.* (2000) que clonaram no vetor binário pCAMBIA 1303 o gene da citrato sintase (CS) de cenoura (*Dauca carota*) sob o controle do promotor específico de raiz de tabaco *ToRB7*.

As análises histoquímicas de plântulas de tabaco transformadas com o vetor pCAMBIA 1303 B21 indicaram que o promotor do gene *Eucgr.G02172* apresenta expressão em feixes vasculares de raízes e folhas de tabaco. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Brandalise (2007), o qual observou que a expressão do gene *gus* sob controle de promotor raiz específico de *Coffea arabica* ocorreu tanto na região epicotiledonar como na região hipocotiledonar de plântulas de tabaco. Entretanto, essa perda de especificidade foi observada apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento da plântula, sendo que, após o surgimento do terceiro par de folhas, nenhum sinal de atividade *gus* foi detectado nessas regiões.

Diante desse relato, seria interessante realizar outras análises histoquímicas com plântulas mais desenvolvidas, uma vez que as plântulas analisadas apresentavam-se em estágios iniciais de desenvolvimento e pode ter ocorrido transcrição de maneira inesperada.

Nas análises de RT-PCR, o gene *Eucgr.G02172* apresentou especificidade no tecido de raiz de *E. grandis* quando comparado aos tecidos de folha e xilema da mesma espécie. No entanto esse resultado contradiz o resultado observado na análise histoquímica. Resultado semelhante foi observado por Rodrigues *et al.* (2013) que estudaram o gene *EgTIP2* de *E. grandis*, o qual apresentou expressão específica nas raízes de eucalipto em análises de RT-PCR qualitativa, porém o mesmo resultado não foi observado quando esse promotor foi inserido em plantas de tabaco. Plantas transgênicas de tabaco (R1) contendo o promotor do gene *EgTIP2* fusionado ao gene *gus*, revelaram expressão em tecidos vasculares em toda a planta e nas extremidades das raízes.

Semelhantemente, Ribeiro (2009) construiu um cassete de expressão contendo um promotor que acreditava ser específico de raiz de *E. grandis*, denominado genericamente de 5B e realizou transformação de plantas de tabaco. Costa (2011) avaliou as plantas de tabaco transformadas com esse gene na geração R1 e, mediante análises histoquímicas, observou que o promotor em estudo dirigia a expressão do gene repórter em tecido vascular de folhas e raízes. Cortes histológicos foram realizados e a expressão em feixes vasculares de folhas e raízes foi confirmada.

Vaughan *et al.* (2006) descrevem o isolamento e a caracterização de um gene homólogo de *TobRB7 TIP* de tomate, chamado *FaRB7*, e o estudo da atividade deste promotor no morangueiro e em tabaco. O promotor de *FaRB7*, clonado a

montante do gene repórter *gus* e introduzido em plantas de morangueiro, mostrou forte expressão raiz específica, com os padrões de expressão muito semelhantes àquele do gene endógeno. Entretanto, em plantas transformadas de tabaco, o promotor *FaRB7* confere expressão constitutiva, comparável ao que é produzido pelo CaMV 35S. Assim, o promotor *FaRB7* pode ser utilizado como promotor tecido específico de raiz em morangueiro e também representa uma alternativa ao promotor CaMV 35S para a produção de expressão constitutiva do gene exógeno em hospedeiros heterólogos.

Outro estudo com promotores foi realizado por Leach e Aoyagi (1991), que descreveram o promotor do gene *ROLD* de *Agrobacterium rhizogenes*, sendo que análises histoquímicas do gene *gus* mostraram que esse promotor apresenta alta expressão nas raízes e pouca expressão em folhas. Apesar de o organismo fonte ser uma bactéria, o promotor é adequado para a expressão em plantas.

Um resultado positivo no caso de promotores específicos de raiz foi obtido por Filichkin *et al.* (2006), que isolaram o gene *ET304* com padrão de expressão predominante em raiz de álamo. Plantas de *Populus* e *Arabidopsis* foram transformadas com o promotor desse gene fusionado ao gene *gus* e as análises histoquímicas demonstraram que o promotor confere forte expressão em raízes. A atividade da beta-glucuronidase foi detectada em primórdios de raízes laterais, meristema apical de raiz, zona de alongamento e no córtex das duas espécies transformadas. Nenhuma atividade significativa do *gus* foi detectada em caules, folhas, inflorescências e outros tecidos.

Da mesma forma, Li *et al.* (2013) isolaram e caracterizaram dois novos promotores específicos de raiz em arroz (*Oryza sativa* L.). Para tal, avaliaram os padrões de expressão dos genes *Os03g01700* e *Os02g37190* em planta de arroz inteira, bem como as atividades promotoras desses genes em arroz transgênico. A região promotora desses dois genes foi ligada ao gene repórter *gus* e plantas de arroz foram transformadas. Análises histoquímicas revelaram que os dois promotores eram ativos nas raízes primárias e secundárias ao longo dos estágios de desenvolvimento da planta, porém não se expressaram em pelos radiculares. De maneira geral, esses promotores são altamente ativos e possuem capacidade de induzir altos níveis de expressão nos tecidos da raiz. Devido a isso, esses promotores podem ser utilizados para dirigir a expressão específica em raízes de plantas transgênicas de arroz e outros cereais podendo ser úteis no que diz respeito

à melhoria de absorção de água e nutrientes, crescimento de raízes, tolerância à seca e resistência a vários patógenos.

Esses resultados permitem pressupor que promotores específicos de raiz de eucalipto, quando validados em tabaco, apresentam comportamento diferente, uma vez que os mecanismos de regulação gênica podem ser distintos para cada espécie. Segundo Cotta *et al.* (2011), pode haver divergência de expressão ao utilizar um mesmo promotor dentro do grupo das angiospermas, pois há muitas vezes diferenças no nível de expressão para monocotiledôneas e dicotiledôneas e, desta forma, pode não existir garantia de que esses reguladores se comportem da mesma forma em plantas perenes e anuais.

Uma forma de diminuir esse tipo de diferença de transcrição seria o uso de uma planta modelo que seja mais parecida com eucalipto, podendo utilizar *Populus*, ou até mesmo a própria espécie, *E. grandis*. O promotor estudado apresenta uma grande aplicabilidade, pois pode ser usado para direcionar a expressão de genes de interesse em tecidos vasculares, tais como genes de resistência a patógenos e insetos.

6 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- Foi possível clonar os promotores do genes *Eucgr.C00918*. e *Eucgr.G02172*, no vetor binário de transformação de plantas pCAMBIA 1303.

-O gene *Eucgr.G02172* de *Eucalyptus grandis* apresenta especificidade nos tecidos de raiz quando comparados aos tecidos de folha e xilema de *E. grandis* em análise de RT-PCR.

-Obteve-se 5 eventos de *Nicotiana tabacum* transformados com o vetor pCAMBIA 1303 B21 os quais expressaram a atividade do gene *gus* em análise histoquímica.

-O promotor do gene *Eucgr.G02172* apresentou-se funcional, direcionando a expressão em regiões de feixes vasculares de raízes e folhas de *Nicotiana tabacum* aclimatadas *in vitro*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante esse trabalho foram construídos dois cassetes de expressão, contendo promotores específicos de raiz de *Eucalyptus grandis* que dirigem a expressão dos gene *gus* e *gfp* fusionados. Essas construções podem ser utilizados para verificar a tecido especificidade dos promotores em outras espécies vegetais.

Novas transformações com os vetores pCAMBIA 1303 A09 e pCAMBIA 1303 B21 devem ser realizadas visando comprovar a tecido especificidade dos promotores clonados.

Para confirmar a transformação dos eventos obtidos é necessário realizar análises moleculares e avaliar a expressão do gene *gfp* nas plantas transformadas, uma vez que as mesmas possuem esse gene em sua construção. Da mesma forma, análises histológicas devem ser realizadas para confirmar a expressão do gene *gus* em tecidos vasculares de folhas e raízes.

Além disso, análises de PCR em tempo real com os eventos obtidos devem ser realizadas para poder quantificar a expressão do promotor do gene *Eucgr.G02172* nos diferentes tecidos de *Nicotiana tabacum*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2012. Brasília, 2013.

ABRAF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2011. Brasília, 2012.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV. 1998.

BRANDALISE, M. **Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos de raiz e folha de *Coffea arabica***. Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu- SP. Botucatu – SP, 2007.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 12-15, 2000.

BUTLER, J.E.F.; KADONAGA J.T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, v.6, p.2583–2592, 2002.

BUTAYE, K. M. J.; CAMMUE, B. P. A.; DELAURÉ, 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.

CARNEIRO, N.P.; CARNEIRO, A. A. Maize Transformation to Obtain Plants Tolerant to Viruses by RNAi Technology. **Genetic Transformation**, In: Alvarez, M. A (Ed.) Istanbul, Turquia: INTECH (Open access publisher), v.1, p.152-160, 2011.

CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A.; PAIVA, E.; CANÇADO, G. M.; ALVES, V. M.; BELELE, C.; PURCINO, A. Tolerância ao alumínio em tabacos transformados com os genes de citrato sintase de planta e bactéria regulada por promotores específicos

de raiz e constitutivo. *In: XXIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo*. Uberlândia, MG, 2000.

CASTELLANOS-HERNÁNDEZ, O, A.; RODRÍGUEZ-SAHAGÚN, A.; ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G. J.; HERRERA-ESTRELLA, L.R. Genetic Transformation of Forest Trees. **Genetic Transformation**, In: Alvarez, M. A (Ed.). Istanbul, Turquia: INTECH (Open access publisher) v.1, p, 191-214, 2011.

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

COSTA, C., S. **Caracterização de promotores de Eucalipto com expressão tecido-específica: raiz e folha**. Dissertação (Mestrado em Genética), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu SP, Botucatu-SP, 2011.

COTTA, M.G., BARROS, L.M.G., ALMEIDA, J.D., SANTOS, D.B.M., ABREU, M.S.; BARBOSA, E.A., VINECKY, F., ANDRADE, A.C., MARRACCINI, P. Isolamento e caracterização do promotor fruto-específico do gene *CALTP1* de *Coffea arabica*. *In: VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 2011, Araxá- MG, *Resumo Expandido*.

DANIELL, H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. **Nature Biotechnology**, v. 20, p.581–586, 2002.

DI CIERO, L.; AMARAL, W. Árvores geneticamente modificadas na silvicultura intensiva. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.29, p.92-98, 2002.

DOYLE, J. J; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12p.13-15, 1990.

FILICHKIN, S. A., WU, Q., BUSOV, V., MEILAN, R., LANZ-GARCIA, C., GROOVER, A.; MA. C., DHARMAWARDHANA, P.; BRUNNER, A.; STRAUSS, S. H. Enhancer trapping in woody plants: Isolation of the *ET304* gene encoding a putative AT-hook motif transcription factor and characterization of the expression patterns conferred by its promoter in transgenic *Populus* and *Arabidopsis*. **Plant Science**, v. 171, n. 2, p. 206-216, 2006.

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

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

GHANEM, M. E., HICHRI, I., SMIGOCKI, A. C., ALBACETE, A., FAUCONNIER, M. L., DIATLOFF, E.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Root-targeted biotechnology to mediate hormonal signalling and improve crop stress tolerance. **Plant Cell Reports**. v. 30, n. 5, p. 807-823, 2011.

GOLLE, D. P., RITTER, L. R. S. R. A., & BEVILACQUAII, C. C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, v. 39, n. 5, 2009.

HOOD, E. E; GELVIN, S. B; MELCHERS, S; HOEKEMA, A. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). **Transgenic Research**. v. 2, p. 208-218, 1993.

HOSHINO, A. A. **Isolamento e caracterização de promotores tecido específicos a partir das informações do Sucest (“Sugarcane Expressed Sequence Tags”)** Tese (Doutorado em Genética), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu–SP, Botucatu-SP, 2007.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 5, p. 387-405, 1987.

JONES M. O., MANNING, K., ANDREWS J., WRIGHT, C. L., TAYLOR, I. B.; THOMPSON, A. J. The promoter from SIREO, a highly-expressed, root-specific *Solanum lycopersicum* gene, directs expression to cortex of mature roots. **Functional Plant Biology**. v.35, p.1224-1233, 2008.

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

LEACH, F. e AOYAGI, K. Promoter analysis of the highly expressed rolC and rolD root inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: Enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated. **Plant Science**, v.79, p.69-76, 1991.

LI, Y.; LIU, S.; YU, Z.; LIU, Y.; WU, P. Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**. v. 207, p. 37-44, 2013.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A, K.M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.103-120, 2003.

KITAJIMA S.; SATO F. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. **The journal of Biochemistry**. v, 125, pg.1-8, 1999.

MANTENIOTIS, S., LEHMANN, R., FLEGEL, C., VOGEL, F., HOFREUTER, A., SCHREINER, B. S., ALTMÜLLER, J., BECKER, C., SCHÖBEL, N., HATT, H., GISSELMANN, G. Comprehensive RNA-Seq Expression Analysis of Sensory Ganglia with a Focus on Ion Channels and GPCRs in Trigeminal Ganglia. **Plos one**, v. 8, n. 11, 2013.

MATSUHARA, S.; JINGU, F.; TAKAHASHI, T.; KOMEDA, Y. Heat-shock tagging: a simple method for expression and isolation of plant genome DNA flanked by T-DNA insertions. **The Plant Journal**, v. 22, p.79-86, 2000.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H.. **A cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo –SP, 2000.

MOREIRA, F, N. **Melhorias no processo de produção de mudas clonais**: O caso da empresa Plantar S/A. 2010. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão Florestal) Programa de Educação Continuada em Ciências Agrárias, UFPR, Curitiba, 2010.

MOURA, V. P. G.; GUIMARÃES, D. P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Brasília: Embrapa, 9 p. (Comunicado Técnico, 85), 2003.

MURASHIGE, T; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; DA SILVA CAMARGO, S.; MARGIS, R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G.. Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in Eucalyptus Species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 405-422, 2012.

PAOLI, L. G. de, CAMARGO, R. L. B., HARAKAVA, R.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO FILHO, F. de A. A. Transformação genética de laranja 'Valência' com o gene cecropin MB39. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.1663-1666, 2007.

PINO, M. T.; SKINNER, J. S.; PARK, E. J.; JEKNIC, Z.; HAYES, P. M.; THOMASHOW, M. F.; CHEN, T. H. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic Atcbf expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 591-604, 2007.

POTENZA, C.; ALEMAN, L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 40, n. 1, p. 1-22, 2004.

ROCHA, M. P. ***Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Eucalyptus dunnii* Maiden como fontes de matéria-prima para serrarias**. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2000.

RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evolutionary Biology**. v. 8, p.1-19, 2008.

RIBEIRO, C.L. **Caracterização molecular de um promotor raiz-específico de Eucalipto**. Trabalho de conclusão (Bacharelado em Ciências Biológicas), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu-SP, Botucatu- SP, 2009.

ROA-RODRIGUES, C. **Promoters Used to Regulate Gene Expression**, 2007. Disponível em: <http://www.patentlens.net/daisy/promoters/239.html>. Acesso em 03 de março de 2013.

RODRIGUES, M. I., BRAVO, J. P., SASSAKI, F. T., SEVERINO, F. E., & MAIA, I. G. The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of *EgTIP2*, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. **Plant Science**, v. 213, p. 106-113, 2013.

SEDJO, R.A. Biotech and planted trees: some economic and regulatory issues. **AgBio Forum**, v. 6 Nº. 3, 2003.

SEVERINO, F.E., BRANDALISE, M., COSTA, C.S., WILCKEN, S.R., MALUF, M.P., GONÇALVES, W., MAIA, I.G. CaPrx, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. **Plant Science**. v.191-192, p.35-42, 2012.

SILVA, J., C. O Eucalipto e suas origens. **Revista da Madeira**, Ed.59º. Curitiba, 2001.

SINGH, K. B. Transcriptional Regulation in Plants: The importance of Combinatorial Control. **Plant Physiology**. v.118, p.1111–1120, 1998.

STEPHEN, T.S., JAMES T. The RNA Polymerase II Core Promoter. **Annual review of biochemistry**. v.72, p.449–479, 2003.

STUDART-GUIMARÃES, C., LACORTE, C., & BRASILEIRO, A. C. M. Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, 2003.

TOMASELLI, I. Processing young Eucalyptus. In: The Future of Eucalypts for Wood Products. Launceston, Tasmania. IUFRO, 2000, p. 167-174, 2000,

TRAPNELL, C., WILLIAMS, B. A., PERTEA, G., MORTAZAVI, A., KWAN, G., VAN BAREN, M. J., SALZBERG, L.S., WOLD, B.J., PACHTER, L. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

TWYMAN, R. M., Ed. Growth and development: Control of gene expression, regulation of transcription. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**. In: Thomas, B.; Murphy, D. J.; Murray. G. B. London UK: Elsevier Science, p.558-567, 2003 a.

TWYMAN, R. M.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 570-578, 2003 b.

TYAGI, A. K. Plant genes and their expression. **Current Science**, v. 80, n. 2, p. 161-169, 2001.

VALDETARO, E. B., CARVALHO, A. P. V., GAMBA, O. S., DEMOLINARI, M. D. S. M.; SILVA, E. Árvores geneticamente modificadas: técnicas, aplicações, riscos e os potenciais impactos associados a sua utilização. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 31, n. 65, p. 51-61, 2011.

VAUGHAN, S. P., JAMES, D.V. LINDSEY, K. MASSIAH, A. J. Characterization of FaRB7, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n.14, p. 3901-3910, 2006.

YAMAMOTO, Y.T.; TAYLOR, C.G.; ACEDO, G.N.; CHENG, C.-L.; CONKLING, M.A. Characterization of *cis*-Acting Sequences Regulating Root-Specific Gene Expression in Tobacco. **Plant Cell**, v.3, p.371-382, 1991.

ZERBINI, F. M.; SILVA F. N. DA; URQUIZA, G.P.C.; BASSO, M.F. Plantas transgênicas, In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R.(Ed.). **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Editora Suprema, Visconde do Rio Branco, p.229-266, 2013.

ZUO, J.; NIU, Q. W.; FRUGIS, G; CHUA, N. H. The WUSCHEL gene promotes vegetative- to-embryonic transition in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 30, p. 349-359, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1 – Composição iônica do meio de cultura MS

Macronutrientes	(mM)
NH ⁺ ₄	20,61
NO ⁻ ₃	39,4
K ⁺	20,04
Ca ⁺ ₂	2,99
Mg ⁺ ₂	1,50
SO ⁻ ₄	1,76
PO ⁻ ₄	1,25
Micronutrientes (μM)	
Mn ⁺ ₂	132
Zn ⁺ ₂	290
Na ⁺ ₂	224
Fe ⁺ ₂	110
Cl ⁻	6000
Co ⁺ ₂	105
Cu ⁺ ₂	100
MoO ⁻ ₄	1030
B ⁺ ₃	5000
NH ⁺ ₄ / NO ⁻ ₃ (mM)	0,52
Total de íons (mM)	94,25

ANEXO 2 - Composição do meio de cultura LB para crescimento bacteriano

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Extrato de levedura	5
Triptona	10
NaCl	10
Ágar	16
pH	7,0

ANEXO 3 - Composição do meio de cultura SOC para crescimento bacteriano

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	(mM)
Extrato de levedura	5	
Triptona	20	
NaCl		10
KCl		2,5
MgCl ₂		10
MgSO ₄		10
pH	7,0	