

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Sistema de Expressão e Sequências Promotoras Artificiais para a Regulação  
Gênica em Plantas**

CAMILA BEDIN SCALCO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre, outubro de 2015

## Instituição e Fontes Financiadoras

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para o desenvolvimento do mesmo, contou-se com bolsa de mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) e recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

## Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que são mais importantes para mim:

Meu pai, o mais generoso de todos os pais, o primeiro e melhor professor que já tive.

Minha mãe, que dedicou sua vida à minha de maneira tão bonita.

Sem vocês conquista nenhuma valeria a pena.

## Agradecimentos

Antes de tudo, agradeço a Deus pela concretização dos Seus sonhos em minha vida.

A meus pais, Reinaldo e Diva, meu infinito agradecimento. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu já não acreditava e por não terem permitido que eu me afastasse do meu propósito. Obrigada pelo apoio incondicional, pela generosidade, carinho e afeto. Não encontro palavras que possam expressar meu agradecimento a vocês, sinto-me, simplesmente, envolvida por um enorme sentimento de gratidão. Muito obrigada.

Agradeço à minha irmã, Caroline, pela fundamental ajuda, pelo amor e apoio que encontrei nos momentos difíceis do mestrado. Sei que não medistes esforços para me ajudar.

À minha avó, Modesta, agradeço pelo exemplo de vida, paciência, bondade e alegria. És uma das pessoas mais incríveis com quem tive a oportunidade de conviver.

Agradeço, de forma especial, ao meu namorado, Eduardo, por todo o amor e apoio que recebi em todos os momentos, principalmente nos de incerteza. Obrigada pela compreensão e paciência que sempre tivestes comigo. És uma pessoa ímpar, em quem busco inspiração para tornar melhor tudo o que faço e farei daqui para adiante. Agradeço à vida pelo maravilhoso privilégio que é poder fazer parte da tua.

Agradeço aos meus colegas do LBMV, que foram e continuam sendo minha família em Porto Alegre. Obrigada pela rica troca e cumplicidade. Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Eu agradeço a vocês, imensamente, pela amizade verdadeira, doce e prestativa, por estarem sempre dispostos a ajudar seja nos pequenos ou nos grandes problemas. Vocês foram fundamentais para a concretização desse trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Giancarlo Pasquali, agradeço pela confiança, pela porta que sempre encontrei aberta, e pelos ensinamentos que recebi ainda durante os meus primeiros passos na vida acadêmica. Muito obrigada.

Gostaria também de agradecer aos professores do mestrado, em especial às professoras Dra. Janette Fett e Dra. Márcia Margis que fizeram parte de minha Comissão de Acompanhamento. Agradeço a todos os professores com os quais tive a honra de poder compartilhar conhecimento, seja durante as disciplinas cursadas, ou durante os seminários e palestras.

À Dra. Franceli Kulcheski meu muito obrigada. Sou grata pela ajuda, ensinamentos, aconselhamentos e por suas contribuições fantásticas.

Agradeço aos secretários do PPGBCM, Sílvia Centeno e Luciano Saucedo, pela atenção, bom humor, boa vontade e profissionalismo.

Agradeço, também, à UFRGS pela incontestável excelência, ao PPGBCM por abrir as portas para a realização deste sonho que era meu mestrado, e ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

## Sumário

Lista de figuras .....	10
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades .....	13
Resumo .....	15
Abstract.....	16
1. Introdução.....	17
1.1 Engenharia genética de plantas e controle da expressão transgênica .....	17
1.2 Promotores eucarióticos .....	18
1.3 Complexidade estrutural dos promotores gênicos .....	22
1.4 Promotores e o controle da atividade de transgenes em plantas.....	23
1.5 O promotor CaMV35S.....	24
1.6 Implicações do emprego frequente do mesmo promotor .....	25
1.7 Desenvolvimento de promotores sintéticos.....	27
1.8 Gene repórter codificador da tdTomato-ER .....	28
1.9 O elemento <i>cis</i> W1 .....	29
1.10 O elemento <i>cis</i> AC .....	30
1.11 O elemento <i>cis</i> RHE.....	31
1.12 Justificativa para o desenvolvimento do projeto.....	32
2. Objetivos .....	33
2.1 Objetivo geral .....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
3. Material e métodos.....	35
3.1. Síntese do CAE.....	35
3.2 Adaptação dos CAEs ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO .....	35
3.2.1 PCR para amplificação do fragmento relativo ao CAE .....	35
3.2.2 Purificação do <i>amplicon</i> do CAE.....	36
3.2.3 Sequenciamento de fragmento de DNA purificado correspondente ao CAE .....	36

3.2.4	Ligação do CAE a pENTR/D-TOPO.....	37
3.2.5	Transformação de <i>E. coli</i> OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-CAE.....	38
3.2.6	Minipreparação de pENTR/D-TOPO-CAE a partir de <i>E. coli</i> OmniMAX 2...39	
3.2.7	PCR para verificação de minipreparações de <i>E. coli</i> OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-CAE positivas .....	39
3.2.8	Clivagens com endonucleases para confirmação da presença do CAE em pENTR/D-TOPO .....	40
3.2.9	Purificação de pENTR/D-TOPO-CAE .....	40
3.2.10	Sequenciamento de DNA para verificar a orientação do CAE em pENTR/D-TOPO .....	41
3.2.11	PCR para amplificação de fragmento relativo ao CaMV35S .....	41
3.2.12	Purificação do <i>amplicon</i> do CaMV35S .....	42
3.2.13	Sequenciamento de fragmento de DNA purificado correspondente ao CaMV35S.....	42
3.2.14	Ligação do CaMV35S ao pENTR/D-TOPO-CAE.....	42
3.2.15	Transformação de <i>E. coli</i> OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-35S-CAE ...	44
3.2.16	Minipreparação de plasmídeos pENTR/D-TOPO-35S-CAE a partir de <i>E. coli</i> OmniMAX 2 .....	44
3.2.17	PCR para verificação de minipreparações de <i>E. coli</i> OmniMAX 2:: pENTR/D-TOPO-35S-CAE positivas .....	44
3.2.18	Clivagens para confirmar a presença do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE.....	45
3.2.19	Purificação de pENTR/D-TOPO-35S-CAE .....	45
3.2.20	Sequenciamento de DNA para verificar orientação de CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE.....	45
3.2.21	Preparar das soluções de estoque dos adaptadores de DNA correspondentes a elementos <i>cis</i> .....	46
3.2.22	Ligação dos adaptadores de DNA correspondentes a elementos <i>cis</i> ao pENTR/D-TOPO-CAE.....	47
3.2.23	Transformação de <i>E. coli</i> OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-CAE modificado pela inserção de diferentes elementos <i>cis</i> .....	47

3.2.24 Minipreparações plasmidiais a partir de colônias de <i>E. coli</i> :: pENTR/D-TOPO -CAE modificado pela inserção de diferentes elementos <i>cis</i> .....	48
3.2.25 Sequenciamentos para verificação de colônias positivas, verificação da orientação de W1 em pENTR/D-TOPO-W1-CAE, orientação de AC em pENTR/D-TOPO-AC-CAE, e orientação de RHE em pENTR/D-TOPO-RHE-CAE .....	48
3.2.26 Purificação de pENTR/D-TOPO-CAE modificado pela inserção de W1 ou AC .....	49
3.3 Adaptação dos CAEs ao vetor binário pKGW .....	49
3.3.1 Recombinações com pKGW.....	49
3.3.2 Transformação genética de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	50
3.3.3 Minipreparação de plasmídeos de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 .....	50
3.3.4 PCR para verificação de minipreparações de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pKGW-CAE.....	51
3.3.5 PCR para verificação de minipreparações de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pKGW-35S-CAE positivas.....	51
3.3.6 PCR para verificação de minipreparações de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pKGW-W1-CAE positivas.....	52
3.3.7 PCR para verificação de minipreparações de <i>A. tumefaciens</i> LBA4404::pKGW-AC-CAE positivas .....	52
3.4 Material vegetal.....	53
3.4.1 Cultura de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53
3.4.2 Transformação genética de <i>A. thaliana</i> .....	54
3.4.3 Assepsia de sementes, meio para cultivo <i>in vitro</i> , germinação e seleção de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> .....	54
3.4.4 Extração do DNA de <i>A. thaliana</i> .....	55
3.4.5 PCR para detecção de transgene em plantas transformadas com pKGW-CAE.....	55
3.4.6 PCR para detecção de transgene em plantas transformadas com pKGW-35S-CAE .....	56
3.4.7 Avaliação da atividade promotora do CAE e 35S-CAE.....	56
4.Resultados.....	58



4.1 Definição, construção, e estrutura do cassete artificial de expressão (CAE) ...	58
4.1.1 Projeção do promotor básico do CAE .....	58
4.1.2 Escolha do gene repórter .....	60
4.1.3 Escolha da sequência terminadora da transcrição .....	60
4.1.4 Sequência e estrutura do CAE .....	60
4.2 Adaptação do CAE ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO .....	62
4.3 Adaptação do CaMV35S ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO-CAE.....	73
4.4 Ligação de adaptadores de DNA correspondentes a elementos <i>cis</i> ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO-CAE .....	82
4.5 Adaptação das diferentes versões de CAEs ao vetor binário pKGW .....	88
4.6 Transformação genética de <i>A. thaliana</i> com <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 armadas com as diferentes versões de pKGW-CAE .....	97
4.7 Ensaios para detecção de fluorescência em <i>A. thaliana</i> transgênicas.....	100
5. Discussão .....	102
6. Conclusão e perspectivas .....	112
7. Referências bibliográficas .....	114
8. Curriculum vitae .....	123

## Lista de figuras

Figura 1: Diagrama representativo de um típico promotor eucariótico. ....	20
Figura 2: Estrutura e composição de um típico TFIIID de células eucarióticas. ....	21
Figura 3: Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO do sistema <i>Gateway</i> . ....	38
Figura 4: Mapa simplificado do T-DNA do plasmídeo pKGW. ....	50
Figura 5: Sequência básica do CAE (1.949 pb). ....	61
Figura 6: Estrutura do CAE básico com representação de sítios de clivagem por endonucleases. ....	62
Figura 7: Mapa do plasmídeo pUC57-CAE. ....	63
Figura 8: Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pUC57-CAE com vistas a gerar o <i>amplicon</i> de CAE para subclonagem em pENTR/D-TOPO. ....	64
Figura 9: Imagem do gel resultante da eletroforese do produto de purificação da banda correspondente ao CAE. ....	64
Figura 10: Alinhamento CAE (forward). ....	66
Figura 11: Alinhamento CAE (reverse). ....	67
Figura 12: Mapa de cobertura do sequenciamento do CAE. ....	67
Figura 13: Imagem do gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem do CAE em pENTR/D-TOPO. ....	68
Figura 14: Imagem do gel de agarose resultante de reação de clivagem da preparação número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE com EcoRV e HincII. ....	68
Figura 15: Mapa do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE. ....	69
Figura 16: Imagem do gel de agarose resultante da purificação do plasmídeo número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE. ....	70
Figura 17: Alinhamento pENTR/D-TOPO-CAE (forward). ....	71
Figura 18: Alinhamento pENTR/D-TOPO-CAE (reverse). ....	72
Figura 19: Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-CAE. ....	73
Figura 20: Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pCAMBIA2300 com vistas a gerar o <i>amplicon</i> do CaMV35S duplicado para subclonagem em pENTR/D-TOPO-CAE. ....	74
Figura 21: Posições de anelamento dos <i>primers</i> CaMV35S-5' e CaMV35S-3' no CaMV35S duplicado originário de pCAMBIA2300. ....	74
Figura 22: Imagem do gel resultante da eletroforese do produto de purificação da banda correspondente ao CaMV35S duplicado. ....	75
Figura 23: Alinhamento CaMV35S (forward). ....	76
Figura 24: Mapa de cobertura do sequenciamento do CaMV35S duplicado. ....	76

Figura 25: Imagem de gel resultante da eletroforese da reação de clivagem de pENTR/D-TOPO-CAE com SmaI. ....	77
Figura 26: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE. ....	78
Figura 27: Imagem de gel resultante da eletroforese de reação de clivagem de 10 preparações de pENTR/D-TOPO-35S-CAE com EcoRv e HincII. ....	78
Figura 28: Mapa do plasmídeo pENTER/D-TOPO-35S-CAE. ....	79
Figura 29: Imagem de gel resultante da eletroforese do produto de purificação da preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE. ....	80
Figura 30: Alinhamento pENTR/D-TOPO-35S-CAE (reverse). ....	81
Figura 31: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE. ....	82
Figura 32: Mapa do plasmídeo pENTER/D-TOPO-W1-CAE. ....	84
Figura 33: Sequência de 364 pb obtida por sequenciamento da preparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE. ....	84
Figura 34: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE. ....	85
Figura 35: Mapa do plasmídeo pENTER/D-TOPO-AC-CAE. ....	86
Figura 36: Sequência de 171 pb obtida por sequenciamento da preparação número 12 de pENTR/D-TOPO-AC-CAE. ....	87
Figura 37: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 12 de pENTR/D-TOPO-AC-CAE. ....	87
Figura 38: <i>Primers</i> forward e <i>reverse</i> projetados para o elemento <i>cis</i> RHE. ....	88
Figura 39: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de CAE em pKGW. ....	89
Figura 40: Mapa do plasmídeo pKGW-CAE. ....	90
Figura 41: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de W1-CAE em pKGW. ....	91
Figura 42: Mapa do plasmídeo pKGW-W1-CAE. ....	92
Figura 43: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de AC-CAE em pKGW. ....	93
Figura 44: Mapa do plasmídeo pKGW-AC-CAE. ....	94
Figura 45: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de 35S-CAE em pKGW. ....	95
Figura 46: Mapa do plasmídeo pKGW-35S-CAE. ....	96
Figura 47: Seleção de plantas transformadas de <i>A. thaliana</i> . ....	97
Figura 48: Imagem de gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de T-DNA de pKGW-CAE em plantas de <i>A. thaliana</i> . ....	99

Figura 49: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de T-DNA de 35S-CAE em plantas de <i>A. thaliana</i> .....	100
Figura 50: Conjunto A de imagens de fluorescência de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> geradas com o emprego do equipamento IVIS Lumina II (CALIPER, 2008). .....	101
Figura 51: Conjunto B de imagens de fluorescência de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i> geradas com o emprego do equipamento IVIS Lumina II (CALIPER, 2008). .....	101

## Lista de abreviaturas, símbolos e unidades

µg: micrograma(s)

µL: microlitro(s)

BSA: albumina do soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*)

CAE: cassete artificial de expressão

CaMV35S: gene codificador do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (do inglês, *cauliflower mosaic virus 35S RNA-encoding gene*)

DNA: ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfatado (do inglês, *deoxyribonucleoside triphosphate*)

ER: retículo endoplasmático (do inglês, *endoplasmic reticulum*)

EtBR: brometo de etídeo

g: grama (s)

GM: geneticamente modificado

h: hora (s)

L: litro (s)

LB: meio de cultura Luria Bertani

mA: miliampere (s)

mg: miligrama(s)

min: minuto (s)

mL: mililitro(s)

mM: milimolar(es)

MS: meio de cultura de Murashige e Skoog

ng: nanograma(s)

° C: grau(s) Celsius

o/n: *overnight*

pb: par(es) de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)

PIC: complexo de pré-iniciação da RNA polimerase II (do inglês, *pre-initiation complex*)

RNA: ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)

rpm: rotação por minuto

RT-qPCR: transcrição reversa seguida da reação quantitativa da DNA polimerase em cadeia

s: segundo (s)

TBE: tampão tris - borato – EDTA

td: dímero em tandem (do inglês, *tandem dimer*)

TE: tampão tris – EDTA

TSS: sítio de início da transcrição (do inglês, *transcriptional start site*)

U: unidade (s) de enzima

UV: radiação ultravioleta

V: volt (s)

## Resumo

A maioria das plantas transgênicas disponíveis atualmente possuem seus insertos regulados por promotores fortes que induzem uma transcrição intensa, permanente e generalizada, o que causa gastos energéticos desnecessários e dificulta a regeneração de um maior número de indivíduos transgênicos. O objetivo principal que norteou o presente trabalho foi desenvolver uma série de vetores plasmidiais contendo sequências promotoras projetadas e artificialmente sintetizadas para modular a expressão de genes de interesse em plantas. O promotor CaMV35S serviu como base para teste de elementos *cis* e geração de novos cassetes artificiais de expressão (CAEs). Os elementos *cis* TATA-*box*, CAAT-*box* e sítio de início da transcrição (TSS) originais da sequência de 90 pb do promotor mínimo CaMV35S foram substituídos pelos consensos já definidos para sequências promotoras de plantas, e a distância entre o TSS e o ATG de início da tradução, que originalmente era de 8 nucleotídeos, foi alterada para 75. Sítios de restrição para endonucleases foram introduzidos em posições estratégicas do promotor de forma a permitir a ligação dos elementos *cis* a serem testados e substituição de genes repórteres por genes de interesse. A distância entre o CAAT-*box* e o TATA-*box*, que originalmente era de 28 pb, foi alterada para 34 pb pela inclusão de um sítio para EcoRV na posição -46 do promotor artificial. Para compor o CAE, foram escolhidos o gene repórter *tdTomato-ER* e o terminador da nopalina sintase (*Tnos*). Foi desenvolvida, também, uma versão do CAE contendo o promotor CAMV35S (35S-CAE) integral para ser utilizada como controle positivo nesse trabalho. A partir de dados da literatura científica, foram selecionados os elementos *cis* W1, AC e RHE cujas atividades foram comprovadas como críticas à expressão regulada em sementes, tecidos vasculares e raízes respectivamente. Os elementos W1 e AC foram adaptados ao sítio de SmaI do CAE, dando origem às versões W1-CAE e AC-CAE. Não foram obtidas versões de RHE-CAE até o momento. Todas as versões do CAE obtidas nesse trabalho foram adaptadas ao vetor pKGW da série *Gateway* e empregadas para a transformação genética de *Arabidopsis thaliana*. Somente plantas transformadas com as versões CAE e 35S-CAE foram recuperadas. Sinais de fluorescências do gene repórter regulado pelas diferentes versões do CAE, necessários para validação da atividade promotora dos mesmos, não foram verificados em quaisquer das plantas recuperadas até o presente.

## Abstract

Most transgenic plants currently available have their inserts regulated by strong promoters that induce intense, permanent, and generalized transcription, which may cause unnecessary energy costs, preventing the regeneration of a larger number of transgenic events. The main purpose of this work was to develop a set of plasmid vectors containing designed promoter sequences, artificially synthesized to modulate the expression of genes of interest in plants. The CaMV35S was used as core promoter to test *cis* elements and to generate new artificial expression cassettes (AECs). Original-TATA *box*, CAAT-*box* and transcriptional start site (TSS) of the minimal 90 bp CaMV35S promoter sequence were replaced by already defined plant consensus sequences, and the distance between TSS and ATG, that was originally of 8 bp, was changed to 75 bp. Endonuclease restriction sites were introduced in strategic positions of the promoter in order to enable the cloning of *cis* elements and the replacement of reporter genes by genes of interest. The distance between CAAT-*box* and TATA-*box*, originally with 28 bp, was changed to 34 bp since one EcoRV site was included at position -46 of the artificial promoter. The reporter gene *TdTomato-ER* and the terminator of the nopaline synthase gene (*Tnos*) were chosen to compose the AEC. It was also developed an AEC version containing the CAMV35S promoter (35S-AEC) to be employed as positive control in this study. The W1, AC and RHE *cis* elements, whose activities were respectively proven as critical to the regulated expression in seeds, vascular tissues and roots, were selected from the scientific literature to be assayed. The W1 and AC *cis* elements were adapted to the SmaI site of the AEC, giving rise to the W1-AEC and AC-AEC versions. We did not obtain RHE-AEC versions. All AEC versions that were obtained in this study were ligated into pKGW vector of the *Gateway* series, and all vectors were employed to genetically transform *Arabidopsis thaliana*. Only plants transformed with the AEC and 35S-AEC versions were recovered. Fluorescence signals of the reporter gene regulated by AEC different versions, which were necessary for validation of promoter activity, were not observed in any of the recovered plants up to the present.



## 1. Introdução

### 1.1 Engenharia genética de plantas e controle da expressão transgênica

Desde o início dos anos de 1980, quando as primeiras plantas transgênicas foram geradas, o desenvolvimento de novas e sofisticadas técnicas moleculares vem possibilitando um intenso progresso na engenharia genética de plantas. A geração dos mais variados tipos de plantas geneticamente modificadas (GM) é hoje rotina em muitos laboratórios comerciais e instituições de pesquisa, onde técnicas moleculares têm sido aplicadas em uma diversidade de espécies (RIVERA *et al.*, 2012).

Geralmente, as plantas são transformadas com genes de interesse comercial, o que pode resultar na obtenção de melhorias de suas características agrônômicas, industriais ou nutricionais. Em 2009, plantas GM foram cultivadas em 25 países por 14 milhões de agricultores (CARPENTER, 2010). Esta constatação e outros resultados da pesquisa realizada por CARPENTER (2010) em 12 países diferentes foram publicados no periódico *Nature Biotechnology* indicando que, com poucas exceções, as culturas GM têm beneficiado os agricultores. A pesquisa mostrou ainda que os maiores beneficiados, principalmente no que diz respeito ao aumento de produtividade, são os pequenos agricultores dos países em desenvolvimento.

Em 2014, segundo JAMES (2014), um recorde de 181,5 milhões de hectares (ha) de culturas GM foi registrado a nível mundial, com crescimento anual observado de 3 a 4% em relação a 2013. No presente ano de 2015 será celebrado o 20º aniversário da primeira comercialização de plantas GM, com culturas e comércio cada vez maiores desde sua adoção. O Brasil, com 42,2 milhões de ha plantados, é o segundo país no mundo com a maior área de plantio e a maior produtividade de grãos GM, posicionando-se entre EUA (1º) e Argentina (3º) (JAMES, 2014).

Alguns exemplos de métodos diretos de transferência de DNA em plantas são a eletroporação, o bombardeamento de partículas (biobalística), a microinjeção e a transformação de protoplastos mediada por polietilenoglicol ou fosfato de cálcio

(choque osmótico) (RAO *et al.*, 2009). No entanto, diferentemente desses, o método mais utilizado para gerar plantas transgênicas explora a habilidade natural que *Agrobacterium tumefaciens*, uma bactéria gram-negativa de solo, possui em transferir um segmento de DNA de um plasmídeo para o genoma das plantas (RIVERA *et al.*, 2012). Em quaisquer dos métodos apontados, a posição de integração do transgene no genoma da planta pode variar consideravelmente entre eventos independentes de transformação, interferindo profundamente no nível de expressão e estabilidade do transgene (EGELKROUT *et al.*, 2012). Mesmo quando plantas transgênicas são geradas a partir de uma mesma construção e sob condições idênticas, diferenças no nível de expressão do gene exógeno podem ser observadas (AHUJA, 2011).

O nível de expressão do transgene e sua induzibilidade dependem também de outros fatores como a presença de íntrons, de regiões 5' e 3' não traduzidas e sinais de poliadenilação. O controle do direcionamento da atividade gênica ainda é um desafio para a engenharia genética de plantas (VENTER & BOTHA, 2010). Por isso, o foco de muitas pesquisas atuais tem sido o "ajuste-fino" da expressão dos transgenes (XIAO *et al.*, 2005; LV *et al.*, 2009; DESAI *et al.*, 2010).

Um cassete gênico de expressão típico contém, além da sequência gênica codificante, sequências promotoras e terminadoras (LEWIN *et al.*, 2014). Sabe-se que o emprego de determinadas sequências regulatórias pode afetar consideravelmente o padrão de expressão de um transgene (BUTAYE *et al.*, 2005). A regulação da expressão transgênica ideal é obtida por meio da combinação da regulação temporal e espacial, e os promotores sintéticos representam uma ferramenta atraente para se alcançar esse objetivo (COMINELLI *et al.*, 2013).

## 1.2 Promotores eucarióticos

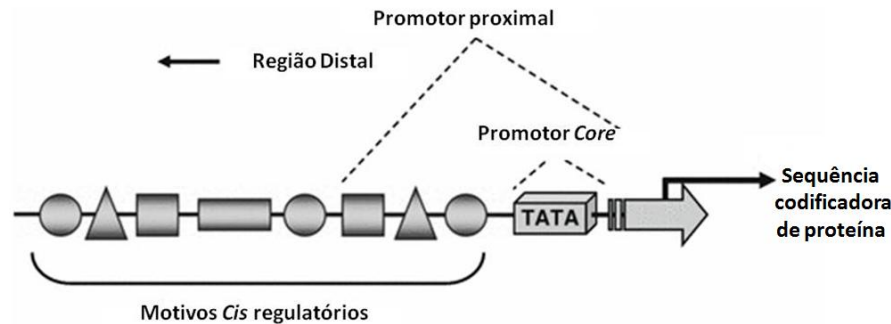
A condensação da cromatina, a metilação do DNA, a iniciação da transcrição, o *splicing* alternativo de RNA, a estabilidade do mRNA, o controle da tradução, as

modificações pós-traducionais e a degradação de proteínas são exemplos dos múltiplos mecanismos empregados por organismos eucariotos para regular a expressão gênica (BRUCE *et al.*, 2014). Dentre todos esses mecanismos, destaca-se o controle do início da transcrição, sendo considerada a etapa mais crítica e mais fortemente regulada na expressão de genes eucarióticos (NECHAEV & ADELMAN, 2011).

Em células eucarióticas, somente alguns genes são expressos em um determinado momento. A decisão dos genes que serão transcritos e a intensidade de transcrição dos mesmos variam consideravelmente durante o ciclo celular e entre os diferentes tipos celulares em resposta a diferentes condições fisiológicas e ambientais (WRAY *et al.*, 2003). A regulação da expressão gênica em organismos multicelulares é complexa e ocorre por meio da ação coordenada de diversos fatores de transcrição (NECHAEV & ADELMAN, 2011). O processo de regulação da transcrição envolve diversas sequências de DNA, denominadas de elementos *cis* e proteínas interatoras – fatores *trans*. O conjunto de elementos *cis* de regulação da transcrição caracterizam regiões promotoras dos genes (HEINTZMAN & REN, 2007; BLAZECK & ALPER, 2013).

Embora muitas exceções existam e melhores definições sejam limitadas por incompetências técnicas, os promotores são comumente definidos como regiões situadas a montante (*upstream*) do início da transcrição de um determinado gene, as quais contêm informações que possibilitam a ativação ou a repressão do gene. Didaticamente, a região promotora divide-se em três partes (Figura 1): (1) a região central ou *core*, a qual está tipicamente localizada a aproximadamente 35 pb a montante do sítio de início de transcrição (TSS, do inglês, *transcriptional start site*), sendo esse o local onde os fatores de transcrição preferencialmente interagem com elementos *cis*; (2) o promotor proximal, região que contém diversos elementos *cis* regulatórios, podendo variar em até algumas centenas de pares de bases a montante do TSS; e (3) o promotor distal, o qual pode variar em milhares de pares de bases a montante do TSS. Nesta região encontram-se elementos regulatórios *cis*

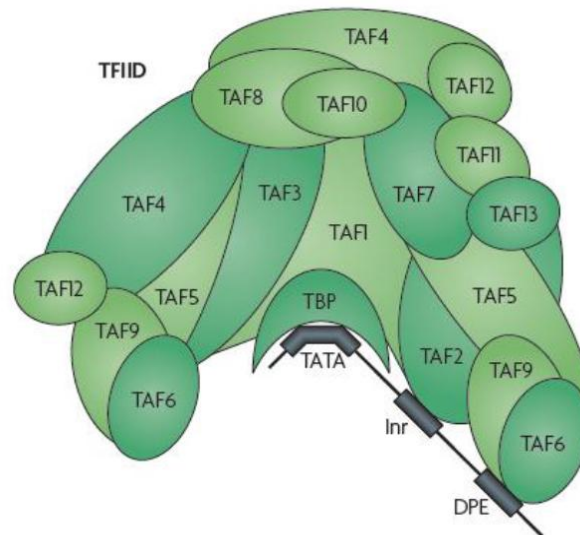
adicionais denominados *enhancers* (aceleradores ou estimuladores) e silenciadores (ABEEL *et al.*, 2008; VENTER & BOTHA, 2010).



**Figura 1: Diagrama representativo de um típico promotor eucariótico.** Esquema adaptado de VENTER & BOTHA (2010).

A região *core* é definida como a porção mínima necessária para direcionar a transcrição. Nesta porção estão localizados elementos regulatórios importantes como o TATA *box*, com a sequência consenso TATAAA, o iniciador (Inr) e/ou o elemento promotor a jusante (DPE, do inglês, *downstream promoter element*; VENTER & BOTHA, 2004). No caso dos genes transcritos pela RNA polimerase II, a própria RNA polimerase II atua juntamente com os fatores de transcrição TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF e TFIIH formando o chamado complexo de pré-iniciação (PIC, do inglês, *pre-initiation complex*) em torno do TSS para dar início ao processo de transcrição. A formação do PIC em promotores que contém TATA *box* é facilitada pela atividade inicial de uma subunidade do TFIID denominada proteína de ligação ao TATA *box* (TBP, do inglês, *TATA box binding protein*), a qual reconhece e liga o elemento TATA *box*. Conforme ilustrado na Figura 2, além de TBP, o fator TFIID é constituído por diversos peptídeos denominados de fatores acessórios de TBP (TAF, do inglês, *TBP accessory proteins*). Em promotores desprovidos de TATA *box*, foi descoberto recentemente o elemento XCPE1 (do inglês, *X gene core promoter element 1*). Localizado na região *core*, o elemento XCPE1 direciona a iniciação da

transcrição pela RNA polimerase II de uma maneira dependente de TBP e independente de TFIID (GOODRICH *et al.*, 2010; VENTER & BOTHA, 2010).



**Figura 2: Estrutura e composição de um típico TFIID de células eucarióticas.** Múltiplas subunidades proteicas ligam-se aos elementos do promotor core. A TBP reconhece o TATA box enquanto as subunidades TAF2 e TAF6 reconhecem, respectivamente, o Inr e o DPE. Adaptado de Goodrich *et al.* (2010).

O Inr pode ser encontrado em promotores providos ou desprovidos de TATA-box. Trata-se de uma sequência rica em bases pirimidínicas (C e T) que circunda o TSS, sendo capaz de direcionar precisamente, por si só ou em conjunto com outros elementos, o ponto de início da transcrição (THOMAS & CHIANG, 2006). Localizado na região 3' do Inr, o DPE também é reconhecido pelo TFIID. A região localizada entre o Inr e o DPE é essencial para a atividade transcricional de promotores sendo que o espaçamento entre esses elementos é considerado crítico para que haja transcrição ótima (GERSHON *et al.*, 2008).

Conforme anteriormente apresentado, as regiões distais e proximais dos promotores gênicos apresentam combinações variadas de sequências *cis* regulatórias as quais podem modular a regulação e a atividade do gene quando interagem com proteínas específicas, denominadas de fatores de transcrição (HEINTZMAN & REN, 2007). Portanto, para que haja produção de mRNA em níveis

significantes, são também necessárias associações de fatores de transcrição com motivos *cis* situados fora da região *core* do promotor. Em muitos casos, diversos fatores *trans* devem interagir entre si para simultaneamente ligarem-se à cromatina e ativarem a expressão de um gene (ZARET & CARROLL, 2011).

O perfil de expressão de um gene é determinado principalmente pela composição e pela configuração dos sítios de ligação para fatores de transcrição situados em sua proximidade. Os sítios de ligação compreendem a menor parte dos nucleotídeos dentro de uma região promotora, a qual é geralmente intercalada por regiões maiores sem sítios de ligação. Os espaçamentos entre os sítios de ligação de fatores de transcrição podem apresentar grandes variações de tamanho, dependendo das interações protéicas que ocorrem durante a ligação aos elementos *cis* (WRAY *et al.*, 2003).

A eficiência de um promotor gênico não pode ser determinada pela simples análise de quais sítios de ligação o compõem, isto é, da riqueza em elementos *cis*. As posições relativas, as orientações, as sequências nucleotídicas dos sítios de ligação e as interações com e entre fatores de transcrição cognatos e cofatores também exercem influência no perfil de transcrição de um gene. Essas interações são complexas, não lineares e o resultado das mesmas pode variar muito dependendo do contexto em que ocorrem (WRAY *et al.*, 2003).

### 1.3 Complexidade estrutural dos promotores gênicos

A complexidade funcional dos promotores gênicos está relacionada com a complexidade estrutural dos mesmos. Os promotores podem ser constitutivos, induzíveis por sinais e tecido- ou estágio-específicos. Essas diferenças ocorrem, pois os requisitos funcionais de regulação variam de acordo com o gene (VENTER & BOTHA, 2010).

Os genes expressos de maneira constitutiva são regulados por promotores simples. Geralmente, apenas um sítio de ligação para um ativador de transcrição

ubíquo é necessário para um promotor que está sempre ativo em qualquer tipo celular. Os promotores de genes expressos exclusivamente em um tipo celular específico são comumente ativados por um ou poucos fatores de transcrição e frequentemente não contem sítios de ligação para repressores. Por outro lado, promotores de genes expressos em estádios específicos do desenvolvimento são considerados mais complexos (WRAY *et al.*, 2003). Uma vez que precisam integrar múltiplas informações, esses promotores apresentam sítios de ligação para muitos reguladores positivos e negativos (LATCHMAN & LATCHMAN, 2010). Assim, a caracterização da arquitetura dos promotores permite a elucidação de sequências regulatórias *cis*, também chamadas de módulos, as quais podem regular o local, o período e o nível de expressão de um gene (MÜLLER & WASSENEGGER, 2004).

#### 1.4 Promotores e o controle da atividade de transgenes em plantas

A capacidade de direcionar a expressão de um transgene a um tecido ou órgão específico de uma planta é uma estratégia biotecnológica importante. Nesse contexto, o promotor do transgene pode ser utilizado como uma ferramenta molecular que permite atingir esse objetivo. Em alguns casos, a expressão do transgene que confere uma determinada característica de interesse pode ter um custo energético alto para a planta. Contudo, esse custo pode ser minimizado caso a expressão do transgene ocorra somente nos tecidos onde é requerida. Isso pode ser observado em genes que conferem tolerância a estresses abióticos e naqueles utilizados para o desenvolvimento de plantas macho-estéreis. Em outros casos, níveis altos de expressão podem ser requeridos especificamente em sementes, o que pode ser possível caso seja empregado um promotor tecido-específico forte. Esse mesmo tipo de promotor também pode ser interessante para direcionar a expressão de proteínas tóxicas exclusivamente para os órgãos das plantas que são alvos preferenciais do ataque de pragas (VIJAYBHASKAR *et al.*, 2008).

As opções de promotores disponíveis atualmente ainda são relativamente limitadas, especialmente promotores capazes de regular a expressão transgênica em diferentes níveis, locais ou etapas do desenvolvimento. Há um pequeno número de promotores que tem sido empregado amplamente nas aplicações biotecnológicas para regular a expressão transgênica. Nesse grupo estão incluídos principalmente os seguintes promotores: CaMV35S, isto é, o promotor do gene codificador do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (ODELL *et al.*, 1985); P<sub>nos</sub>, promotor do gene da nopalina sintase de *A. tumefaciens* (AN *et al.*, 1990); e P<sub>ubi</sub>, promotor da ubiquitina do milho (CHRISTENSEN *et al.*, 1992). Dentre esses, destaca-se o promotor CaMV35S como o mais utilizado em pesquisas de biologia molecular de plantas (VENTER & BOTHA, 2010).

### 1.5 O promotor CaMV35S

O promotor CaMV35S é um promotor forte e constitutivo que pode ser usado para regular a expressão de genes de interesse em plantas. No CaMV, esse promotor é responsável pela produção do RNA 35S, o qual cobre o genoma total do vírus. Uma vez que a atividade do promotor não é dependente de polipeptídeos codificados pelo genoma do CaMV, fatores de transcrição do próprio hospedeiro possibilitam a atividade do promotor em células de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (LAM, 1994).

O promotor CaMV35S apresenta três domínios: a região *core*, o domínio A e o domínio B. Na região *core* (-46 à +8 pb) está localizado o promotor mínimo que contém o TATA *box*. O domínio A (-90 à -46 pb) desempenha uma atividade acessória, sendo responsável por potencializar a atividade transcricional de elementos *enhancers* que estão situados a montante. O domínio B (-343 à -90 pb) divide-se em cinco subdomínios, os quais são denominados B1, B2, B3, B4 e B5. Nessa região ocorrem interações com diversos fatores de transcrição (FANG *et al.*, 1989; BENFEY & CHUA, 1990).



BENFEY e CHUA (1990) realizaram estudos combinatórios de ganho de função a fim de determinar as funções dos domínios A e B. De acordo com os autores, quando somente o domínio A é fusionado ao promotor mínimo, não há expressão gênica. Contudo, se o domínio A for combinado com o domínio B será observada expressão transgênica em células vegetais. Esse fato indica que sequências importantes estão contidas nos subdomínios do domínio B e que, juntamente com o domínio A e a região *core*, esse domínio possibilita a regulação de transgenes em plantas. Os autores demonstraram ainda que interações sinérgicas entre os elementos *cis* do promotor CaMV35S podem exercer um papel importante, pois essas definem padrões de expressão tecido-específicos.

Estudos posteriores realizados por BULLAR *et al.* (2003, 2007, 2010) permitiram demonstrar que promotores sintéticos com homologia mínima ao promotor CaMV35S podem ser desenvolvidos por meio da troca ou rearranjo de elementos *cis* do próprio promotor CaMV35S. A expressão do transgene regulado por alguns dos promotores sintéticos desenvolvidos pelo grupo foi equivalente à conferida pelo promotor CaMV35S original. Assim, o promotor CaMV35S é considerado um modelo molecular altamente relevante para o estudo de atividades combinatórias de elementos *cis* e para o desenvolvimento de novos promotores sintéticos de planta (MEHROTRA *et al.*, 2011).

## 1.6 Implicações do emprego frequente do mesmo promotor

O desenvolvimento de vegetais geneticamente modificados pela inserção simultânea de dois ou mais transgenes em seus genomas tem se tornado comum nos últimos anos. O empilhamento ou piramidização de transgenes possibilita, por exemplo, que uma mesma planta apresente tolerância a herbicidas e a insetos concomitantemente. Como a disponibilidade de promotores adequados é limitada, esses transgenes acabam sendo frequentemente regulados por promotores idênticos ou homólogos, o que aumenta as chances de ocorrer silenciamento gênico

ocasionado por homologia ou mecanismos compensatórios capazes de viabilizar a disputa pelos mesmos fatores de transcrição (QUE *et al.*, 2010).

O silenciamento gênico ocasionado por homologia tem sido frequentemente descrito em plantas transgênicas. Esse fenômeno pode ser resultado de uma inativação ocorrida em nível transcricional ou pós-transcricional que reflete a tendência natural de interação entre sequências repetidas de DNA observada em eucariotos. Existem evidências que comprovam que o pareamento entre sequências homólogas de DNA funciona como sinal de metilação (EIKE *et al.*, 2005). O silenciamento gênico ocasionado por homologia pode ocorrer não somente como consequência do uso repetitivo do mesmo promotor, mas também quando múltiplas cópias de um cassete de expressão integram-se no genoma da planta durante o processo de transformação, ou quando o transgene ou promotor apresenta homologia com algum gene ou promotor endógeno (BHULLAR *et al.*, 2003).

Há décadas, diversos casos de silenciamento envolvendo transgenes regulados pelo promotor CaMV35S tem sido observados. Isso pode ser explicado pelo fato do promotor CaMV35S ser um promotor constitutivo muito forte, o qual é capaz de induzir a produção de RNA do transgene em quantidades suficientemente grandes para ativar mecanismos que dependem de uma concentração de RNA limiar. Além disso, trata-se de um promotor de origem viral e, portanto, pode ser alvo dos mecanismos de defesa das plantas (MATZKE & MATZKE, 1995).

O silenciamento gênico ocasionado por homologia é considerado um dos principais desafios atuais que limitam os avanços da engenharia genética de plantas (VENTER & BOTHA, 2010). Uma estratégia para evitar esse fenômeno envolve o emprego de cassetes de expressão com promotores diferentes. Esses podem ser funcionalmente equivalentes, mas devem apresentar homologia mínima entre suas sequências (BHULLAR *et al.*, 2003).

## 1.7 Desenvolvimento de promotores sintéticos

Promotores sintéticos são ferramentas moleculares importantes, pois permitem a flexibilização do controle de transgenes (MOORE *et al.*, 2006). De acordo com BHULLAR *et al.* (2003), promotores sintéticos podem ser desenvolvidos de duas maneiras: elementos *cis* identificados em um determinado promotor podem ser inseridos em uma fita de DNA sintética ou, então, pode ser feita uma "troca de domínios", onde elementos *cis* de um promotor são substituídos por regiões funcionalmente equivalentes originárias de promotores heterólogos.

O contexto dos elementos *cis* dentro de um promotor, isto é, suas posições, espaçamento, orientação, número de cópias e combinações também pode ser modificado para dar origem a um novo promotor (VENTER, 2007). Contudo, sabe-se que a presença e a localização de qualquer elemento *cis* em um promotor fornecem apenas pistas limitadas a respeito da influência que o mesmo exerce sobre a expressão gênica. Logo, os resultados de combinações experimentais entre elementos regulatórios em um promotor sintético não são completamente previsíveis. O mesmo elemento *cis* pode ser responsável pela ativação da transcrição em um promotor, e pela repressão em outro (CAZZONELLI & VELTEN, 2008).

Diversos elementos *cis* de DNA já foram definidos por meio de análises de sequências promotoras de origem vegetal existentes (YAMAMOTO *et al.*, 2007; JONES & SPARKS, 2009) e estão disponíveis para pesquisa em ferramentas de bioinformática como *PlantCARE*, *PlantPromoterDB* e *PLACE*, cujos sítios podem ser acessados na *internet*. Porém, análises experimentais são necessárias para decifrar como eles trabalham em conjunto nos promotores modulando a transcrição (CAZZONELLI & VELTEN, 2008). Nesse contexto, promotores sintéticos desempenham um papel importante na elucidação da lógica existente entre elementos *cis* e podem ser utilizados em estudos de regulação gênica (VENTER, 2007).

Para testar a viabilidade de uma sequência promotora sintética recomenda-se o emprego de genes repórteres cuja expressão possa ser facilmente detectada e quantificada (JONES & SPARKS, 2009). A maior parte dos promotores sintéticos

desenvolvidos até o momento teve sua atividade e eficiência avaliada por meio da expressão de genes codificadores de diferentes versões da luciferase (LUC), da proteína de fluorescência verde, (GFP, do inglês, *green fluorescent protein*), ou da  $\beta$ -glicuronidase (GUS) (VENTER & BOTHA, 2010).

### 1.8 Gene repórter codificador da tdTomato-ER

O emprego de proteínas de fluorescência como genes repórteres em plantas possibilitou grandes avanços em estudos de biologia molecular. Essas proteínas podem, por exemplo, ser fusionadas às proteínas de interesse para o controle de localização celular (STEWART, 2006). Genes repórteres codificadores de proteínas fluorescentes também têm sido utilizados para caracterizar a atividade de promotores vegetais, incluindo os tecido-específicos (MANN *et al.*, 2012).

Atualmente já estão disponíveis proteínas fluorescentes de diversas cores, entretanto a proteína GFP, originária de águas-vivas como *Aequorea victoria*, continua sendo empregada na maioria dos estudos publicados (MANN *et al.*, 2012). Além da GFP, outra proteína fluorescente que tem se destacado é a DsRed, uma proteína originária de corais *Discosoma sp.* que emite luz vermelha sob excitação (DIETRICH & MAISS, 2002). Muitos tecidos vegetais apresentam autofluorescência verde e vermelho-extrema e, por esta razão, as proteínas de fluorescência vermelha e laranja destacam-se mais facilmente nesses tecidos (MANN *et al.*, 2012). Mutações sistemáticas foram introduzidas no gene codificador da DsRed com vistas a incrementar a intensidade de fluorescência emitida originalmente pela proteína e alterar suas propriedades espectrais para tornar seu emprego como gene repórter mais eficiente. Dessa maneira, foram desenvolvidas quatro diferentes proteínas capazes de emitir luz laranja. A proteína tdTomato, com excitação a 554 nm e emissão a 581 nm, faz parte deste grupo de proteínas modificadas (SHANER *et al.*, 2005).

MANN *et al.* (2012) realizaram estudos comparativos entre proteínas nativas e modificadas de fluorescência vermelha/laranja para avaliar suas eficiências como repórteres em tecidos vegetais. Foram desenvolvidas também versões modificadas das proteínas pela adição de um domínio de ligação ao retículo endoplasmático (ER) para cada proteína analisada. Os resultados encontrados pelos autores em experimentos de epifluorescência, microscopia confocal e espectroscopia de fluorescência realizados com plantas transgênicas de *A. thaliana*, *Nicotiana benthamiana* e *Nicotiana tabacum* transformadas com os diferentes genes codificadores sob controle do promotor CaMV35S apontaram que tdTomato-ER é a proteína que mais emite fluorescência em tecidos vegetais e, portanto, a mais adequada para utilização como gene repórter em plantas. O domínio de ligação ao ER adicionado em tdTomato-ER fez com que a proteína passasse a emitir o dobro da fluorescência em comparação à tdTomato original. Portanto, o gene codificador da tdTomato-ER como gene repórter pode permitir que pesquisadores identifiquem a expressão transgênica em plantas com mais facilidade do que outros genes repórteres (MANN *et al.*, 2012).

### 1.9 O elemento *cis* W1

Lectinas de leguminosas formam um grande grupo de proteínas homólogas encontradas principalmente em sementes (LIOI *et al.*, 2005). Essas proteínas desempenham papel importante na defesa das plantas contra predadores e patógenos. Diversos genes codificadores de lectinas vem sendo revelados por estudos bioquímicos e moleculares, sugerindo que ainda há muito para ser explorado (DE HOFF *et al.*, 2009).

PATER *et al.* (1993) desenvolveram estudos utilizando o promotor do gene codificador da lectina de ervilha como modelo para elucidar mecanismos moleculares relacionados com a expressão gênica semente-específica em plantas. Os autores demonstraram por meio de experimentos de ganho de função que o elemento *cis*

denominado W1 (5'-GACACGTAGAATGAGTCATCAC-3'), presente no promotor da lectina de ervilha, contém um elemento *enhancer* semente-específico. Um trímero desse elemento foi fusionado à região promotora mínima do CAMV35S (-46 à +8 pb) juntamente com o gene da  $\beta$ -glicuronidase de *Escherichia coli* (*gusA*). Desta forma, foi verificada uma baixa expressão do gene repórter em raízes, pecíolos e folhas e alta expressão em sementes de tabaco transgênico portadoras dessa construção. A expressão do gene repórter foi aumentada durante o período de maturação da semente e diminuiu consideravelmente poucos dias após a germinação. Este padrão de expressão foi idêntico ao conferido pelo fragmento de 2.000 pb correspondente ao promotor do gene da lectina de ervilha, o que indica que o elemento *cis* W1 contém todas as informações necessárias para conferir, por si só, expressão semente-específica (PATER *et al.*, 1993).

#### 1.10 O elemento *cis* AC

A identificação dos mecanismos moleculares envolvidos na rota de síntese da lignina pode permitir avanços biotecnológicos importantes no setor florestal, especialmente no madeireiro (ZHONG & YE, 2009). O entendimento do controle transcricional de genes associados ao metabolismo das ligninas, por exemplo, auxiliaria na resolução de alguns problemas congênitos de gêneros florestais como os do *Eucalyptus*, *Pinus*, *Populus* e *Acacia*, os quais apresentam rachaduras e danos na pós-colheita (ABREU *et al.*, 2003).

Ao longo das últimas três décadas, diversos genes envolvidos na rota de síntese da lignina foram identificados e caracterizados. Os chamados elementos *cis* AC foram estudados primeiramente no promotor da fenilalanina amônia-liase (PAL), enzima que catalisa a primeira etapa da síntese dos fenilpropanóides, os quais são precursores da lignina. Posteriormente, resultados de análises de bioinformática demonstraram que os elementos AC estão presentes na maioria dos promotores de

genes que participam da rota biossintética da lignina em *A. thaliana* (ZHONG & YE, 2009).

A hipótese de que os elementos AC são suficientes para direcionar a expressão gênica especificamente ao xilema foi comprovada por SÉGUIN *et al.* (1991). De acordo com os resultados obtidos pelos autores, um heptâmero do elemento AC-II (5'-ACCAACC-3'), originário do promotor PAL de salsa, fusionado ao promotor mínimo do CaMV35S, é capaz de direcionar a expressão de *gusA* ao xilema de plantas de tabaco transgênicas.

HATTON *et al.* (1995) identificaram três tipos de elementos AC, envolvidos em expressão xilema-específica, no promotor PAL de feijoeiro. Os autores demonstraram que mutações em AC-I (5'-ACCTACC-3') ou AC-II (5'-ACCAACC-3') levaram à diminuição da expressão do gene *gusA* em xilema de tabaco transgênico e aumento de expressão do mesmo em floema. Mutações simultâneas em AC-I e AC-II resultaram em perda total da expressão do gene repórter em xilema. Mutações no elemento AC-III (5'-ACCTAAC-3'), no entanto, causaram apenas uma pequena diminuição de expressão no xilema. Esses fatos indicam que a atividade combinada dos elementos AC possibilita a expressão gênica xilema-específica (HATTON *et al.*, 1995).

### 1.11 O elemento *cis* RHE

Pelos radiculares são considerados prolongamentos das células epidérmicas de raízes (CHO & COSGROVE, 2002). Os pelos radiculares de *A. thaliana* originam-se de células epidérmicas que contatam o córtex subjacente. Este tipo celular é conhecido como célula H (GALWAY *et al.*, 1994). Portanto, genes expressos especificamente em células que compõem pelos radiculares são denominados genes H. O elemento *cis* RHE (*Root Hair Element*) controla a expressão celular-específica de todos os genes H conhecidos (WON *et al.*, 2009).

O elemento RHE desempenha a mesma função biológica tanto em *A. thaliana* quanto em outras angiospermas. Sua sequência central consiste de 16 ou 17

nucleotídeos que apresentam uma estrutura palindrômica incompleta, sendo 5'- ATC GTGNNN(N)GCACGTC-3' a sequência consenso. Diversas sequências variantes funcionais desse elemento já foram descritas. Na grande maioria dos promotores que contêm variantes de RHE, o elemento localiza-se em até no máximo 2.600 pb a montante do códon de iniciação (WON *et al.*, 2009).

De acordo com estudos realizados por WON *et al.* (2009), *A. thaliana* apresenta em seu genoma 81 genes, predominantemente expressos em raiz, cujos promotores contem uma ou mais cópias do elemento RHE localizadas em até 1.000 pb a montante do códon de iniciação. Os mesmos autores realizaram ensaios experimentais onde 29 promotores com uma ou mais cópias de RHE foram fusionados ao gene repórter codificador de GFP. Sinais de GFP foram observados especificamente na zona morfogênica de raízes de *A. thaliana* transformadas com 19 dessas construções, demonstrando que os elementos RHE são realmente capazes de direcionar a expressão para células H. Outras sete construções deram origem a sinais de GFP em todo o epitélio da raiz e apenas três delas deram origem ao mesmo padrão de sinais que o controle (WON *et al.*, 2009).

#### 1.12 Justificativa para o desenvolvimento do projeto

A limitada disponibilidade de sequências promotoras capazes de regular a expressão transgênica em níveis, em órgãos/tecidos, em etapas específicas do desenvolvimento vegetal e em resposta a determinados sinais foi a principal razão que motivou o desenvolvimento do presente trabalho. A razão secundária, e não menos importante, residiu no fato de haver na literatura relatos frequentes de silenciamento gênico causado por homologia decorrente do emprego repetitivo dos mesmos promotores. Propôs-se, então, o desenvolvimento de um cassete artificial de expressão (CAE) que permitisse a avaliação de novas sequências promotoras sintéticas, as quais poderiam contribuir para a solução, pelo menos em parte, destes problemas.



## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma série de vetores plasmidiais contendo sequências promotoras artificiais capazes de modular a expressão de genes de interesse em plantas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Projetar um arcabouço básico de promotor vegetal contendo sequência de DNA com atividade promotora neutra (básica) ou nula, além de sítios de restrição especificamente dispostos para a inserção e avaliação de elementos *cis* de regulação da transcrição gênica vegetal;
- Definir gene(s) repórter(es) mais adequado(s) e sequência terminadora da transcrição para fusão à região promotora artificial e testes da mesma.
- Viabilizar a síntese da região promotora artificial, gene repórter e sequência terminadora, conjuntamente denominados “Cassetes Artificiais de Expressão” (CAEs).
- Adaptar os CAEs a vetores plasmidiais binários da série *Gateway*, combinando os mesmos com gene marcador;

- Avaliar o nível de expressão do gene repórter promovido pelo promotor dos CAEs básicos por meio da transformação genética de *A. thaliana* e avaliação das plantas transgênicas;
- Selecionar e viabilizar a síntese de adaptadores de DNA que correspondam aos elementos *cis* W1, AC e RHE e ligar os mesmos ao promotor dos CAEs.
- Avaliar a atividade dos promotores modificados pela adição dos elementos *cis* W1, AC e RHE através da análise do nível de expressão do gene repórter em plantas de *A.thaliana* transformadas com os CAEs.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Síntese do CAE

A síntese do CAE foi realizada pela empresa norte americana *GenScript Inc.* (Piscataway, NJ, EUA) pelo método da fosforamidita (KOSURI & CHURCH, 2014). O plasmídeo original de clonagem empregado pela empresa para fornecimento das sequências sintetizadas foi o pUC57 (*GenScript*).

#### 3.2 Adaptação dos CAEs ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO

##### 3.2.1 PCR para amplificação do fragmento relativo ao CAE

Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi realizada no termociclador LGC XP (Bioer) com o objetivo de amplificar a região correspondente ao CAE, originalmente clonado no vetor pUC57 (*GenScript*), contendo 1.949 pb. Os *primers* utilizados nesta reação foram projetados e denominados CAEv2-5' (5'-CACCCG GGATCTCCACTGACG-3') e CAEv2-3' (5'-AAGCTTCCCGATCTAGTAACATAGATG ACA-3'). Como DNA-molde para a PCR, foram utilizados 0,02 µg de pUC57-CAE. A reação foi constituída de 1,0 µL de *Pfu* DNA Polimerase a 2,5 U/µL (Fermentas, Waltham, MA, EUA); 5,0 µL de *Pfu* Buffer com MgSO<sub>4</sub> 10x (Fermentas); 2,0 µL de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) a 5 mM; 1,5 µL de cada *primer* a 10 µM; e água ultrapura para completar o volume final de 50 µL. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95 °C por 2 min seguida de 35 ciclos em temperaturas de 95 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, e 72 °C por 4 min, sendo finalizado com uma etapa a 72 °C por 15 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada

por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 1,5 h, com aplicação de 5 µL da reação em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (EtBr) a 0,01 mg/L. Posteriormente, o *amplicon* foi visualizado sob luz UV e imagem digital foi gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

### 3.2.2 Purificação do *amplicon* do CAE

Após verificação de obtenção de resultado positivo na PCR para amplificação do CAE descrita no item 3.2.1, os 45 µL restantes da reação foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos à nova eletroforese. Em seguida, a banda de 1.949 pb correspondente ao *amplicon* do CAE foi cortada do gel e purificada com emprego do *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, EUA), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA ).

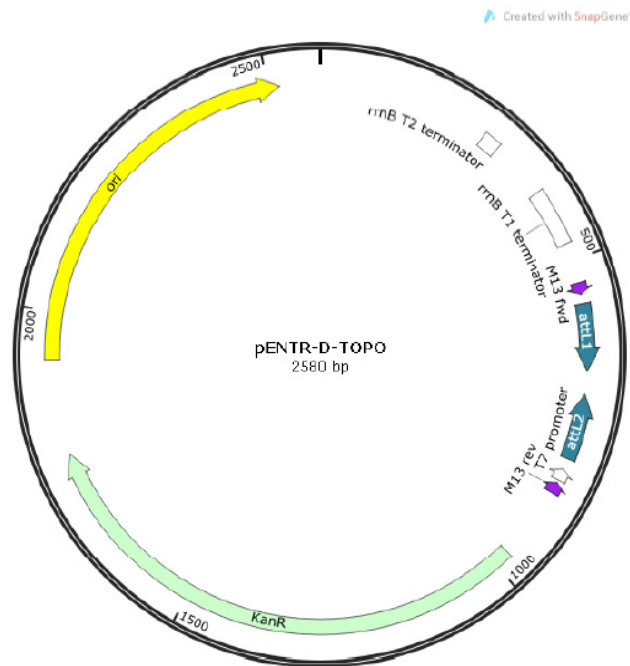
### 3.2.3 Sequenciamento de fragmento de DNA purificado correspondente ao CAE

A confirmação da integridade do fragmento de DNA purificado correspondente ao CAE foi realizada por meio de sequenciamento de DNA. O sequenciamento da amostra foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O DNA-molde (250 ng) foi marcado utilizando-se 2,5 pmol do *primer CAEv2-5'* ou 2,5 pmol do *primer CAEv2-3'*, e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP *Cycler* com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por

3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcada, a amostra foi purificada pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. O produto precipitado foi diluído em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturado a 95 °C por 5 min, resfriado em gelo por 5 min e eletroinjetado no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection 2* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"; Mobility File "KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500\_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100"; e Analysis Module 1 "BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz"*. O alinhamento da sequência obtida no sequenciamento *versus* a sequência do CAE foi feito utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

#### 3.2.4 Ligação do CAE a pENTR/D-TOPO

O *amplicon* purificado do CAE foi ligado a pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) (Figura 3), plasmídeo de entrada do sistema *Gateway* por meio da ação da enzima topoisomerase I. Na reação de ligação, utilizou-se 1,0 µL de DNA purificado a 20 ng/µL; 1,0 µL de Solução Salina (NaCl a 1,2 M; MgCl<sub>2</sub> a 0,06 M); 1,0 µL de pENTR/D-TOPO (Invitrogen) a 20 ng/µL e água ultrapura para completar o volume final de 6,0 µL. Depois de mantida a temperatura ambiente por 5 min, a reação foi utilizada para a transformação genética de células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX 2 (item 3.2.5).



**Figura 3: Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO do sistema Gateway.** Figura gerada no programa *SnapGene 2.5* a partir da sequência de nucleotídeos original. M13fwd - *primer forward* do sítio de clonagem; M13rev - *primer reverse* do sítio de clonagem; T7 - região promotora para expressão do inserto; attL2, attL1 - sítios de recombinação específica para o sistema Gateway; rrnB T1 terminator - sequência terminadora para expressão basal em *E. coli*; rrnB T2 terminator-sequência terminadora para expressão basal em *E. coli*; KanR- gene (*nptII*) marcador de seleção para canamicina; ori - sítio da origem de replicação.

### 3.2.5 Transformação de *E. coli* OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-CAE

Células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX 2 foram preparadas conforme protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) e armazenadas em ultrafreezer a -80°C. As células foram submetidas à transformação genética por meio de choque térmico. Para tanto, utilizou-se 100 µL de células termocompetentes e 2 µL da reação de ligação do CAE a pENTR/D-TOPO. Esta mistura foi incubada no gelo por 20 min e, em seguida, prosseguiu-se com o choque térmico em banho-maria a 42 °C por 2 min. Adicionou-se 1 mL de meio Luria-Bertani (LB) e se incubou a 37 °C com agitação de 180 rpm durante 1 h. Após a transformação, 100 µL da suspensão

bacteriana foram distribuídas com alça de Drigalski em placas de Petri com meio LB sólido contendo canamicina a 50 mg/L. As placas foram mantidas *overnight* (*o/n*) em estufa à 37 °C.

### 3.2.6 Minipreparação de pENTR/D-TOPO-CAE a partir de *E. coli* OmniMAX 2

Colônias de *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-CAE resultantes da transformação genética por choque térmico foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB líquido contendo 50 mg/L de canamicina. As culturas foram mantidas *o/n* à 37 °C e 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA). As minipreparações de plasmídeos foram realizadas pelo método de lise alcalina descrito por BIMBOIM e DOLY (1979) com alterações propostas por JONES e SCHOFIELD (1990).

### 3.2.7 PCR para verificação de minipreparações de *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-CAE positivas

A PCR para confirmação da inserção do CAE em pENTR/D-TOPO foi realizada com os *primers* CAEv2-5' e CAEv2-3'. Como DNA-molde para as reações, foi utilizado cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades, assim como o programa básico de termociclagem e avaliação do resultado dessa reação foram realizados conforme descrito no item 3.2.1.

### 3.2.8 Clivagens com endonucleases para confirmação da presença do CAE em pENTR/D-TOPO

A confirmação da presença do CAE em pENTR/D-TOPO também foi realizada por meio de reação de clivagem com endonucleases. Para tanto, uma minipreparação PCR-positiva para CAE foi escolhida. Procedeu-se a reação de clivagem com as endonucleases EcoRV a 10 U/ $\mu$ L (Promega) e HincII a 7 U/ $\mu$ L (Pharmacia, Piscataway, NJ, EUA). A reação foi realizada com 2  $\mu$ L de DNA plasmidial a aproximadamente 1  $\mu$ g/ $\mu$ L, 0,5  $\mu$ L de cada endonuclease, 2  $\mu$ L de tampão Multicore 10x (Promega), 0,3  $\mu$ L de BSA a 10 mg/mL (Promega) e água ultrapura para completar um volume final de 20  $\mu$ L. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 h. A avaliação do resultado da reação foi realizada por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 2 h, com aplicação do volume total da reação em gel de agarose a 1% corado com EtBR a 0,01 mg/L, o qual foi posteriormente exposto à luz UV e fotografado por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

### 3.2.9 Purificação de pENTR/D-TOPO-CAE

Uma purificação do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE proveniente de colônia de *E. coli* positiva, confirmada por PCR e por reação de clivagem, foi realizada a partir de cultura de 10 mL de meio LB contendo canamicina a 50 mg/L. A cultura foi mantida *o/n* à 37 °C e 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). Para purificação dos plasmídeos, utilizou-se o *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) seguindo-se instruções do fabricante. O plasmídeo purificado foi quantificado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific) seguindo instruções do fabricante.



### 3.2.10 Sequenciamento de DNA para verificar a orientação do CAE em pENTR/D-TOPO

Duas alíquotas de 0,5 µL do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE purificado, contendo 78,6 ng de DNA cada, foram submetidas ao sequenciamento de DNA visando confirmar a orientação dos sítios de integração do CAE no plasmídeo. Neste sequenciamento, os *primers* utilizados foram o CAEv2-For1730 (5'-CTGTTGCCGGTCTTGCGATG-3'), e o CAEv2-Rev155 (5'-TGATTGCCCTTTGGGATCTGCG-3'). As condições desta reação foram estabelecidas e executadas exatamente da mesma maneira descrita no item 3.2.3. O alinhamento da sequência obtida no sequenciamento *versus* a sequência do pENTR/D-TOPO-CAE foi feito utilizando o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

### 3.2.11 PCR para amplificação de fragmento relativo ao CaMV35S

PCR foi realizada em termociclador LGC XP (BIOER) com o objetivo de amplificar a região correspondente ao CaMV35S a partir do vetor pCAMBIA2300 (CAMBIA), contendo 651 pb. Os *primers* utilizados nesta reação foram o CaMV35S-5' (5'-CACCCGGGATGGTGGAGCACGACACTCTC-3') e o CaMV35S-3' (5'-ACTACATCAATCCACTTGC-3'). Como DNA-molde, foram utilizados 20 ng de pCAMBIA2300. A reação foi constituída de 1,0 µL de *Pfu* DNA Polimerase a 2,5 U/µL (Fermentas); 5,0 µL de *Pfu Buffer* com MgSO<sub>4</sub> 10x (Fermentas); 2,0 µL de dNTP's a 5 mM; 1,5 µL de cada *primer* a 10 µM; e água ultrapura para completar um volume final de 50 µL. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos em temperaturas de 95 °C por 30 s, 54 °C por 30 s, e 72 °C por 2 min, sendo finalizado com uma etapa a 72 °C por 5 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 1 h, com aplicação de 5 µL da reação em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,01 mg/L. Posteriormente, o *amplicon* foi

visualizado sob luz UV e imagem digital foi gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

### 3.2.12 Purificação do *amplicon* do CaMV35S

Após verificação de obtenção de resultado positivo na PCR para a amplificação do CaMV35S (item 3.2.11), os 45  $\mu$ L restantes da reação foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a nova eletroforese. A banda de 651 pb correspondente ao *amplicon* do CaMV35S foi removida do gel e purificada com *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em *NanoDrop 2000c* (Thermo Scientific) também conforme orientações do fabricante.

### 3.2.13 Sequenciamento de fragmento de DNA purificado correspondente ao CaMV35S

A confirmação da integridade do fragmento de DNA purificado correspondente ao CaMV35S foi realizada por meio de sequenciamento de DNA, utilizando-se o *primer* CaMV35S-5'. As condições de reação foram estabelecidas e executadas conforme descrito no item 3.2.3. O alinhamento da sequência obtida no sequenciamento *versus* a sequência do CaMV35S foi feito utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

### 3.2.14 Ligação do CaMV35S ao pENTR/D-TOPO-CAE

O *amplicon* purificado do CaMV35S foi ligado a pENTR/D-TOPO-CAE no sítio de *Sma*I. Para tanto, procedeu-se primeiramente a reação de digestão com 6  $\mu$ L da

minipreparação plasmidial de pENTR/D-TOPO-CAE a 0,17 µg/µL, 1 µL de SmaI a 12 U/µL (Promega), 3 µL de Tampão J 10X (Promega), e água ultrapura para completar um volume de 30 µL. Esta mistura foi incubada por 2 h a 25 °C em termociclador LGC XP (BIOER). A avaliação do resultado da reação de clivagem foi realizada por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 2 h, com aplicação de 3 µL da reação em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,01 mg/L, o qual foi posteriormente exposto à luz UV e fotografado por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad). Em seguida, foi realizada a reação de ligação por meio da ação da enzima T4 DNA ligase. Para esta reação, definiu-se que a razão molar entre inserto e vetor seria de 3:1 por ser essa a razão recomendada pelo fabricante da enzima. Um total de 100 ng de vetor foi utilizado pois esta é a quantidade definida como ideal para a reação pelo fabricante da enzima T4 DNA ligase (Promega). O cálculo para definição de quantidade de inserto a ser utilizada foi realizado por meio da seguinte fórmula:

$$x \text{ ng inserto} = \frac{(\text{razão molar}) (\text{pb inserto}) (\text{ng vetor})}{(\text{pb vetor})}$$

Onde razão molar = 3:1; pb do inserto = 600; ng de vetor = 100; pb do vetor = 2580.

Assim, a reação de ligação foi composta por 3,0 µL de pENTR/D-TOPO-CAE SmaI-cut a aproximadamente 30 ng/µL, 12,54 µL de CaMV35S purificado a 5,6 ng/µL, 1,0 µL de SmaI a 12 U/µL (Promega), 0,5 µL de T4 DNA Ligase a 3 U/µL (Promega), 2,0 µL de Tampão de Ligação 10X (Promega) e água ultrapura para completar um volume final de 20,0 µL. Esta mistura foi incubada por 18 h a 15 °C em termociclador LGC XP (BIOER) e posteriormente foi armazenada a -20°C.

### 3.2.15 Transformação de *E. coli* OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-35S-CAE

Células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX 2 foram submetidas à transformação genética por meio de choque térmico. Nesta reação, utilizou-se 100 µL de células termocompetentes e 5 µL da reação de ligação do CaMV35S ao pENTR/D-TOPO-CAE. O procedimento de choque térmico para transformação genética foi realizado essencialmente conforme descrito no item 3.2.5.

### 3.2.16 Minipreparação de plasmídeos pENTR/D-TOPO-35S-CAE a partir de *E. coli* OmniMAX 2

Colônias de *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-35S-CAE resultantes da transformação genética por choque térmico foram minipreparadas conforme descrito no item 3.2.6.

### 3.2.17 PCR para verificação de minipreparações de *E. coli* OmniMAX 2:: pENTR/D-TOPO-35S-CAE positivas

A PCR para confirmação da inserção do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE *SmaI-cut* foi realizada com os *primers* CaMV35S-5' e CaMV35S-3'. Como DNA-molde para as reações, foi utilizado cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades, assim como o programa básico de termociclagem e avaliação do resultado dessa reação, foram realizados conforme descrito no item 3.2.11.

### 3.2.18 Clivagens para confirmar a presença do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE

A confirmação da presença do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE também foi realizada por meio de reação de clivagem. Para tanto, 13 minipreparações plasmídicas foram escolhidas. Procedeu-se a reação de clivagem com as endonucleases EcoRV a 10 U/ $\mu$ L (Promega) e HincII a 7 U/ $\mu$ L (Pharmacia), com os mesmos reagentes e condições descritas no item 3.2.8. O método de avaliação de resultado de reação também foi realizado conforme descrito no mesmo item.

### 3.2.19 Purificação de pENTR/D-TOPO-35S-CAE

Uma purificação do plasmídeo pENTR/D-TOPO-35S-CAE proveniente de colônia de *E. coli* positiva, confirmada por PCR e reação de clivagem, foi realizada da mesma maneira como descrito no item 3.2.9. O plasmídeo purificado foi quantificado em *NanoDrop* 2000c (Thermo Scientific) segundo instruções do fabricante.

### 3.2.20 Sequenciamento de DNA para verificar orientação de CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE

Duas alíquotas de 0,5  $\mu$ L do plasmídeo pENTR/D-TOPO-35S-CAE purificado, cada um contendo 107 ng de DNA, foram submetidas ao sequenciamento visando confirmar a orientação dos sítios de integração do CaMV35S no plasmídeo. Neste sequenciamento, realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda., o *primer* utilizado foi o CAEv2-Rev155. As condições de reação foram estabelecidas conforme descrito no item 3.2.3. O alinhamento da sequência obtida no sequenciamento *versus* a sequência esperada de pENTR/D-TOPO-35S-CAE foi feito utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

### 3.2.21 Preparar das soluções de estoque dos adaptadores de DNA correspondentes a elementos *cis*

Oligonucleotídeos correspondentes às sequências codificadoras e complementares dos elementos W1 (5'-GACACGTAGAATGAGTCATCAC-3'), AC (5'-ACCTACCACCTACCACCAACCACCAACC-3') e RHE (5'-ATCGTGACGTGCACGTC-3') foram sintetizados pela empresa *IDT Technologies Inc* (San Diego, CA, EUA). O elemento W1 foi sintetizado conforme sua sequência original, descrita por PATER *et al.* (1993); já o elemento AC selecionado foi representado pela dimerização e fusão dos elementos AC-1 e AC-2 (ZHONG & YE, 2009); e o elemento RHE foi representado pela sequência consenso deduzida para elementos RHE (WON *et al.*, 2009) com introdução dos nucleotídeos centrais ACGT. Estes três elementos foram recebidos na forma de *primers* de fita simples, sendo cada um deles designado pelo nome do elemento *cis* que representa acrescido da sigla "*For*", quando se tratava de *primer forward* (cadeia codificadora), ou "*Rev*", quando se tratava de *primer reverse* (cadeia complementar). Primeiramente, as massas desses seis *primers* foram diluídas em água ultrapura resultando em soluções-estoque de 200 ng/ $\mu$ L. Em seguida, 10  $\mu$ L de cada uma das três soluções-estoque "*For*" foram misturados com outros 10  $\mu$ L das três soluções-estoque "*Rev*" complementares e 80  $\mu$ L de tampão TE. As misturas foram homogeneizadas em vórtex e, posteriormente, transferidas para termociclador LGC XP (BIOER) onde foram aquecidas por 5 min a 96°C e mantidas a 43°C por 30 min. Este procedimento foi realizado para possibilitar o anelamento dos *primers* complementares e consequente formação de adaptadores de DNA correspondentes aos elementos *cis* dupla-fita. Por fim, 1  $\mu$ L de cada mistura foi diluído em 99  $\mu$ L de TE dando origem às soluções de uso dos adaptadores W1, AC e RHE a 2 ng/ $\mu$ L.

### 3.2.22 Ligação dos adaptadores de DNA correspondentes a elementos *cis* ao pENTR/D-TOPO-CAE

Uma cópia do elemento W1 foi clonada em pENTR/D-TOPO-CAE no sítio de *Sma*I. A reação de clivagem de pENTR/D-TOPO-CAE com a endonuclease *Sma*I e de ligação do inserto ao vetor foram realizadas essencialmente como descrito no item 3.2.14. A reação de ligação foi composta por 3,0 µL de pENTR/D-TOPO-CAE *Sma*I-*cut* a aproximadamente 30 ng/µL, 1,0 µL da solução de W1 a 2,0 ng/µL, 1,0 µL de *Sma*I a 12 U/µL (Promega), 1,5 µL de T4 DNA Ligase a 3 U/µL (Promega), 2,0 µL de Tampão de Ligação 10X (Promega) e água ultrapura para completar um volume final de 20,0 µL. Esta mistura foi incubada por 18 h a 15°C em termociclador LGC XP (BIOER) e posteriormente armazenada em *freezer* a -20 °C. O mesmo procedimento foi realizado em etapas individuais posteriores para ligação de uma cópia do elemento AC e uma cópia de RHE em pENTR/D-TOPO-CAE *Sma*I-*cut*.

### 3.2.23 Transformação de *E. coli* OmniMAX 2 com pENTR/D-TOPO-CAE modificado pela inserção de diferentes elementos *cis*

Células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX 2 foram submetidas a transformações genéticas por meio de choque térmico. Para cada transformação, utilizou-se 100 µL de células termocompetentes e 5 µL de cada reação de ligação descrita no item 3.2.22 (pENTR/D-TOPO-W1-CAE, pENTR/D-TOPO-AC-CAE, pENTR/D-TOPO-RHE-CAE). O procedimento de choque térmico para a transformação genética foi realizado conforme descrito no item 3.2.5.

### 3.2.24 Minipreparações plasmidiais a partir de colônias de *E. coli*:: pENTR/D-TOPO - CAE modificado pela inserção de diferentes elementos *cis*

Colônias de *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-W1-CAE, *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-AC-CAE, e *E. coli* OmniMAX 2::pENTR/D-TOPO-RHE-CAE resultantes das transformações genéticas por choque térmico foram minipreparadas conforme descrito no item 3.2.6.

### 3.2.25 Sequenciamentos para verificação de colônias positivas, verificação da orientação de W1 em pENTR/D-TOPO-W1-CAE, orientação de AC em pENTR/D-TOPO-AC-CAE, e orientação de RHE em pENTR/D-TOPO-RHE-CAE

Dezesseis alíquotas de 1,0 µL de pENTR/D-TOPO-W1-CAE, 16 de igual volume de pENTR/D-TOPO-AC-CAE, e outras 16 de igual volume de pENTR/D-TOPO-RHE-CAE provenientes das minipreparações descritas no item 3.2.24 e contendo aproximadamente 100 ng de DNA cada foram submetidas ao sequenciamento para verificação de colônias positivas e orientações dos sítios de integração dos três diferentes elementos *cis* no plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE. Nestes sequenciamentos, realizados pela ACTGene Análises Moleculares Ltda., utilizou-se o *primer* CAEv2-Rev155 (5'-TGATTGCCCTTTGGGATCTGCG-3'). As condições destas reações foram estabelecidas conforme descrito no item 3.2.3. As sequências de pENTR/D-TOPO-W1-CAE, pENTR/D-TOPO-AC-CAE, e pENTR/D-TOPO-RHE-CAE obtidas no sequenciamento foram analisadas manualmente e individualmente para verificar quanto a presença e orientação dos respectivos elementos *cis* nas mesmas.



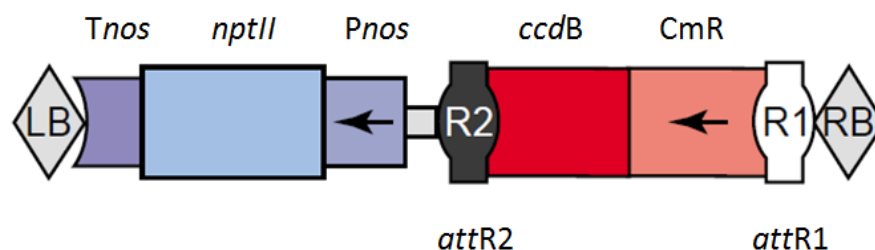
### 3.2.26 Purificação de pENTR/D-TOPO-CAE modificado pela inserção de W1 ou AC

Purificações dos plasmídeos pENTR/D-TOPO-W1-CAE e pENTR/D-TOPO-AC-CAE provenientes de colônias de *E. coli* positivas com elementos *cis* clonados na orientação senso, confirmadas por sequenciamento, foram realizadas da mesma maneira como descrito no item 3.2.9. Os plasmídeos purificados foram quantificados em *NanoDrop* 2000c (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

## 3.3 Adaptação dos CAEs ao vetor binário pKGW

### 3.3.1 Recombinações com pKGW

As reações de recombinação entre os plasmídeos pENTR/D-TOPO-CAE, pENTR/D-TOPO-35S-CAE, pENTR/D-TOPO-W1-CAE e pENTR/D-TOPO-AC-CAE e o vetor binário pKGW [KARIMI *et al.* (2002); Figura 4] foram realizadas por meio da enzima LR clonase com o uso do *kit* LR Clonase II (Invitrogen). Cerca de 100 ng de cada um dos vetores de entrada (pENTR/D-TOPO-CAE, ou pENTR/D-TOPO-35S-CAE, ou pENTR/D-TOPO-W1-CAE ou pENTR/D-TOPO-AC-CAE), 150 ng do vetor de destino (pKGW) e T.E. 1x suficiente para completar um volume final de 8  $\mu$ L foram adicionados em tubos individuais de microcentrífuga de 0,6 mL sob temperatura ambiente. Em seguida, foram executados os passos descritos no protocolo do fabricante.



**Figura 4: Mapa simplificado do T-DNA do plasmídeo pKGW.** Imagem adaptada de KARIMI *et al.* (2002). Mapa do T-DNA do vetor binário da série *Gateway*. Os diferentes CAEs foram inseridos entre R2 e R1 e combinados com o gene de resistência à canamicina (*nptII*). attR2, attR1- sítios de recombinação específica para o sistema *Gateway*; Tnos – Terminador do gene da nopalina sintase; Pnos – promotor do gene da nopalina sintase; *ccdB* – gene codificador da proteína bloqueadora da DNA girase; CMR – gene codificador da cloranfenicol acetiltransferase; LB – Borda esquerda do T-DNA (*Left Border*); RB – Borda direita do T-DNA (*Right Border*).

### 3.3.2 Transformação genética de *Agrobacterium tumefaciens*

Células termocompetentes de *A. tumefaciens* LBA4404 foram submetidas a transformações genéticas por meio de choque térmico. Para cada transformação, utilizou-se 100 µL de células termocompetentes e 5 µL de cada recombinação descrita no item 3.3.1 (pKGW-CAE, pKGW-35S-CAE, pKGW-W1-CAE, pKGW-AC-CAE). O procedimento de choque térmico para transformação genética foi realizado conforme protocolo descrito por BRASILEIRO e CARNEIRO (1998). Após as transformações, 100 µL de cada suspensão bacteriana foram distribuídos com alça de Drigalski em placas de Petri com meio LB sólido contendo rifampicina a 50 mg/L e espectinomicina a 100 mg/L. Estas placas foram mantidas por 48 h a 28°C para a formação de colônias.

### 3.3.3 Minipreparação de plasmídeos de *A. tumefaciens* LBA4404

Colônias de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-CAE, ::pKGW-35S-CAE, ::pKGW-W1-CAE, e ::pKGW-AC-CAE resultantes das transformações genéticas por choque térmico foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB líquido contendo rifampicina

a 50 mg/L e espectinomicina a 100 mg/L. As culturas foram mantidas por 48 h a 28°C e 180 rpm em agitador rotacional (New Brunswick Scientific). As minipreparações de plasmídeos dessas colônias foram realizadas pelo método de lise alcalina descrito por BIMBOIM e DOLY (1979) com alterações propostas por JONES e SCHOFIELD (1990).

#### 3.3.4 PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-CAE

A PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-CAE positivas foi realizada com os *primers* CAEv2-5' e CAEv2-3'. Como DNA-molde para as reações foi utilizado cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades, assim como o programa básico de termociclagem e avaliação do resultado dessa reação, foram definidos e realizados conforme descrito no item 3.2.1.

#### 3.3.5 PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-35S-CAE positivas

A PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-35S-CAE positivas foi realizada com os *primers* CaMV35S-5' e CaMV35S-3'. Como DNA-molde para as reações foi utilizado cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades, assim como o programa básico de termociclagem e avaliação do resultado dessa reação foram definidos e realizados conforme descrito no item 3.2.11.

### 3.3.6 PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-W1-CAE positivas

A PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-W1-CAE positivas foi realizada com os *primers* W1-For (5'-GACACGTAGAATGAGTCATCAC-3') e CAEv2-3'. Como DNA molde para as reações foram utilizados cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. A reação foi constituída de 0,5 µL de *Go Taq Hot Start Polimerase* a 5,0 U/µL (Promega); 10,0 µL de *Green Go Taq Flexi Buffer 5x* (Promega); 4,0 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM; 2,0 µL de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) a 5 mM; 2,0 µL de cada *primer* a 10 µM; amostra de DNA plasmidial e água ultrapura para completar um volume final de 50 µL. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos em temperaturas de 95°C por 1 min, 48°C por 1 min, e 72°C por 2 min, sendo finalizado com uma etapa a 72°C por 5 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 1 h, com aplicação de 5 µL da reação em gel de agarose a 1% corado com EtBR a 0,01 mg/L. Posteriormente, os *amplicons* foram visualizados sob luz UV, e imagem digital foi gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

### 3.3.7 PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-AC-CAE positivas

A PCR para verificação de minipreparações de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-AC-CAE positivas foi realizada com os *primers* AC-For (5'-ACCT ACCACCTACCACCAACCACCAACC-3') e CAEv2-3'. Como DNA molde para as reações foram utilizados cerca de 1 µg de cada minipreparação plasmidial. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades foram empregados como descrito no 3.3.6. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95°C por 2 min,

seguida de 30 ciclos em temperaturas de 95°C por 1 min, 53°C por 1 min, e 72°C por 2 min, sendo finalizado com uma etapa a 72°C por 5 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada conforme descrito no 3.3.6.

### 3.4 Material vegetal

#### 3.4.1 Cultura de *Arabidopsis thaliana*

Neste trabalho, foram utilizadas plantas de *A. thaliana* do ecótipo Columbia-0. As sementes selvagens, não transformadas (*wild-type*) foram gentilmente cedidas pelas Dras. Márcia M.A.N. Pinheiro Margis e Fernanda Lazzarotto (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS). Antes da semeadura, as sementes foram ressuspensas em solução de agarose a 0,05% e mantidas em geladeira a 4 °C por 3 dias no escuro. Este tratamento foi realizado com o objetivo de estratificar as sementes. Em seguida, pequenas quantidades de sementes foram semeadas em recipientes plásticos de 200 mL contendo solo do tipo turfa (*Garden Plus*), levemente umedecido com água estéril, previamente autoclavado e peneirado. Os recipientes contendo turfa e sementes de *A. thaliana* foram dispostos em bandejas plásticas contendo uma lâmina baixa de água pura, a qual foi repostada semanalmente durante todo o período de cultivo, permanecendo em câmara de crescimento a 22°C sob fotoperíodo longo (16 h de luz e 8 h de escuro). Durante os primeiros 10 dias de cultivo, período necessário para as plântulas desenvolverem folhas verdadeiras, a bandeja permaneceu coberta com filme plástico tipo PVC, o que possibilitou a criação de um ambiente úmido ideal para o estabelecimento das plântulas.

### 3.4.2 Transformação genética de *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* Columbia-0 foram transformadas com *A. tumefaciens* LBA4404 armada com os seguintes plasmídeos: pKGW, pKGW-CAE, pKGW-35S-CAE, pKGW-W1-CAE e pKGW-AC-CAE. O método utilizado para as transformações foi o de imersão de inflorescências (“*Floral dip*”) em suspensão de agrobactérias, conforme descrito por ZHANG *et al.* (1996). Foram submetidas ao procedimento de transformação genética 15 plantas para cada uma das construções citadas.

As plantas submetidas à transformação genética permaneceram em câmara de crescimento nas condições descritas no item 3.4.1 por aproximadamente 20 dias, tempo necessário para o desenvolvimento e a maturação de siliquis e sementes. Depois deste período, a irrigação das plantas foi suspensa por aproximadamente um mês objetivando a dessecação completa das mesmas, procedimento que facilita a coleta de sementes.

### 3.4.3 Assepsia de sementes, meio para cultivo *in vitro*, germinação e seleção de plantas transgênicas de *A. thaliana*

Todas as manipulações de meio de cultivo e materiais vegetais para cultura *in vitro* foram realizadas em cabine de fluxo laminar horizontal modelo PA200 (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Sementes T1 obtidas das plantas submetidas ao procedimento de transformação e sementes controle de *A. thaliana* foram submetidas à assepsia superficial mergulhando-as em pequenos grupos em cerca de 1 mL de etanol a 70% por 10 min com agitação ocasional em vórtex, seguido de 1 mL de etanol a 95% por 2 min com agitação ocasional e duas lavagens em 1 mL de água destilada estéril com agitação vigorosa. Posteriormente, as sementes foram ressuspensas em solução estéril de agarose 0,05%, sendo realizado o mesmo tratamento para estratificação descrito no item 3.4.1. Após assepsia, as sementes ressuspensas em agarose foram dispostas em placas de Petri contendo meio de

MURASHIGE & SKOOG (1963; MS; Sigma) acrescido de ágar a 4% e contendo canamicina a 100 mg/L. As placas contendo as sementes foram incubadas em câmara de cultivo nas mesmas condições descritas no item 3.4.1. Tanto sementes transgênicas quanto sementes não-transgênicas foram capazes de germinar em meio de cultura seletivo contendo canamicina. Porém, as plântulas oriundas de sementes não-transformadas não foram capazes de manter seu desenvolvimento e crescimento após 10 dias. Por outro lado, plântulas oriundas de sementes transformadas desenvolveram-se normalmente em meio de cultura seletivo contendo canamicina, mantendo coloração verde intensa, formando folhas verdadeiras e raízes. Portanto, as plântulas que demonstraram estas características foram selecionadas e transplantadas para recipientes plásticos de 200 mL contendo solo do tipo turfa levemente umedecido com água estéril, previamente autoclavado e peneirado, permanecendo em câmara de cultivo até completarem seu ciclo de desenvolvimento.

#### 3.4.4 Extração do DNA de *A. thaliana*

A extração do DNA de *A. thaliana* selecionadas conforme descrito no item 3.4.3 foi realizada pelo método CTAB, descrito por DOYLE e DOYLE (1987). As amostras de DNA foram posteriormente quantificadas em *NanoDrop* 2000c (Thermo Scientific) segundo orientações do fabricante.

#### 3.4.5 PCR para detecção de transgene em plantas transformadas com pKGW-CAE

A PCR para detecção do CAE em plantas transformadas com pKGW-CAE foi realizada com os *primers* CAEv2-5' e CAEv2-3'. Como DNA-molde para as reações foi utilizado cerca de 1 µg de DNA extraído de plantas de *A. thaliana* T1 e controles. A reação foi constituída de 0,5 µL de *Go Taq Hot Start Polimerase* a 5,0 U/µL

(Promega); 6,0 µL de *Green Go Taq Flexi Buffer 5x* (Promega); 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM; 2,0 µL de dNTP's a 5 mM; 1,5 µL de cada *primer* a 10 µM; e água ultrapura para completar um volume final de 30 µL. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos em temperaturas de 95°C por 1 min, 54°C por 1 min, e 72°C por 2 min, sendo finalizado com uma etapa a 72°C por 5 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada por eletroforese em cuba horizontal (Bio-Rad) com tampão TBE 1X a 69 V e 130 mA durante 1 hora, com aplicação de 5 µL da reação em gel de agarose a 1% corado com EtBr a 0,01 mg/L. Posteriormente, o *amplicon* foi visualizado sob luz UV e imagem digital foi gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

#### 3.4.6 PCR para detecção de transgene em plantas transformadas com pKGW-35S-CAE

A PCR para detecção do CaMV35S em plantas transformadas com pKGW-35S-CAE foi realizada com os *primers* CaMV35S-For493 e CAE-REv155. Os demais reagentes e suas respectivas quantidades foram determinados e utilizados da mesma maneira como descrito no item 3.4.5. O programa básico de termociclagem incluiu uma etapa a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos em temperaturas de 95°C por 1 min, 45°C por 1 min, e 72°C por 2 min, sendo finalizado com uma etapa a 72°C por 5 min. A avaliação do resultado da reação foi realizada conforme descrito no item 3.4.5.

#### 3.4.7 Avaliação da atividade promotora do CAE e 35S-CAE

Foram realizadas tentativas de avaliação da atividade dos promotores artificiais por meio de observação da fluorescência da proteína repórter tdTomato-ER em diversos tecidos e órgãos de plantas transgênicas de *A. thaliana*. Para tanto,



utilizou-se lanterna armada com lâmpada de luz verde (554 nm) e óculos de filtro vermelho. Posteriormente, as plantas foram fotografadas com o aparelho IVIS Lumina II (CALIPER, 2008).

## 4.Resultados

Os dados a seguir apresentados são oriundos de atividades realizadas com o objetivo de desenvolver sequências promotoras artificiais capazes de modular a expressão de genes de interesse em plantas. Desta forma, os resultados obtidos estão apresentados em tópicos que abrangem todas as etapas moleculares executadas desde a projeção do promotor artificial até a obtenção de vetores plasmidiais binários para transformação de plantas, além da obtenção e análise de plantas transgênicas de *A. thaliana*.

### 4.1 Definição, construção, e estrutura do cassete artificial de expressão (CAE)

#### 4.1.1 Projeção do promotor básico do CAE

O arcabouço do promotor do CAE desenvolvido nesse trabalho foi projetado a partir da região -90 a +1 do promotor CAMV35S original, cuja sequência foi publicada por BENFEY *et al.* (1990). Elementos *cis* canônicos necessários para assegurar a atividade basal em promotores vegetais tiveram suas sequências consensos e posições relativas definidas por JOSHI (1987) e SHAHMURADOV *et al.* (2003). Essas sequências consensos foram utilizadas na composição do promotor do CAE. Assim, a sequência original do TATA *box* do promotor CAMV35S (TATATAA) foi alterada para TATAAATA. As sequências dos elementos CAAT *box* e do sítio de início da transcrição não foram modificadas por estarem de acordo com os consensos definidos para vegetais pelos autores anteriormente citados.

De forma a permitir a substituição de quaisquer dos elementos presentes no CAE, tais como promotor artificial, genes repórteres, terminadores, ou a inclusão de outros elementos *cis* de regulação gênica, sítios de restrição para endonucleases

que produzem extremidades “cegas” foram introduzidos em posições estratégicas do promotor, o que permite clonagens na orientação senso e antissenso. Para permitir os trabalhos de clonagem, foram escolhidos sítios para enzimas de restrição ausentes na região promotora e na sequência do plasmídeo original de clonagem.

A distância entre CAAT *box* e TATA *box*, originalmente de 28 pb no promotor de CaMV35S, foi alterada para 34 pb pela inclusão de um sítio para *EcoRV* na posição -46 do promotor artificial. Não foram realizadas alterações na distância entre TATA *box* e TSS pois esta já está de acordo com a distância consenso encontrada em promotores vegetais (SHAHMURADOV *et al.*, 2003).

TSS e sequência ATG que em eucariotos determina o início da tradução (KOZAK, 1999) tiveram seu distanciamento alterado de 8 para 75 pb. Esta distância foi definida como média dos promotores vegetais com mais alta taxa de transcrição (YAMAMOTO *et al.*, 2011). A sequência de 75 nucleotídeos foi selecionada por meio de um alinhamento das sequências presentes entre TSS e ATG realizado com emprego do programa *ClustalW* (THOMPSON *et al.*, 1994), entre um grupo de 18 plasmídeos binários escolhidos aleatoriamente e os 100 primeiros nucleotídeos presentes após o TSS do promotor CaMV35S (GenBank: M90543.1). Este grupo de plasmídeos binários foi composto por pCXGFP-P (GenBank: FJ905225.1), pCGTAG (GenBank: DQ370422.1), pCsGFPBT (GenBank: DQ370426.1), pN3-phiC31 (GenBank: GU564446.1), pCGTNG2 (GenBank: DQ370425.2), pCAMBIA1305 (GenBank: AF354045.1), pGFPGUSplus (GenBank: EF546437.1), pCCRE (GenBank: EU327977.1), pCGTNG1 (GenBank: DQ370425.1), piGL (GenBank: EF426459.1), pUB-GFP (GenBank: AB303068.1), pCOXS3-phiC31 (GenBank: GU564445.1), pVCPGUS (GenBank: JQ436738.1), pGV4945 (GenBank: AY141042.1), pZP (GenBank: AY995143.1), pFYFPBT (pFYFPBT), pRE1 (GenBank: M28531.1), pCS4-BASK(GenBank: HQ593861.1), cujas sequências foram obtidas em buscas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Após o alinhamento das sequências presentes entre TSS e ATG desses plasmídeos, decidiu-se optar pela sequência de 75 nucleotídeos do plasmídeo binário pCGTAG por ser a sequência mais conservada presente no grupo analisado. O códon ATG

originalmente presente na região -7 à -5 de pCGTAG foi alterado para ATC de forma a evitar início errôneo de tradução.

#### 4.1.2 Escolha do gene repórter

De acordo com o trabalho de MANN *et al.*(2012), a versão tdTomato-ER do gene codificador de proteína de fluorescência laranja é o melhor gene repórter para plantas transgênicas. Por esta razão, este gene foi escolhido para compor o CAE. A sequência de tdTomato-ER utilizada neste trabalho foi derivada do plasmídeo pRSET-B (Invitrogen).

#### 4.1.3 Escolha da sequência terminadora da transcrição

Neste trabalho, a sequência terminadora do gene codificador da nopalina-sintase de *A. tumefaciens* ( $T_{nos}$ ) foi escolhida para ser fusionada ao gene repórter tdTomato-ER, completando o CAE. Realizou-se esta escolha pois a sequência terminadora  $T_{nos}$  está entre as mais frequentemente utilizadas para a expressão transgênica em plantas (MERIC *et al.*, 2004). A sequência correspondente ao  $T_{nos}$  utilizada nesse trabalho foi derivada do plasmídeo pCAMBIA1302 (CAMBIA).

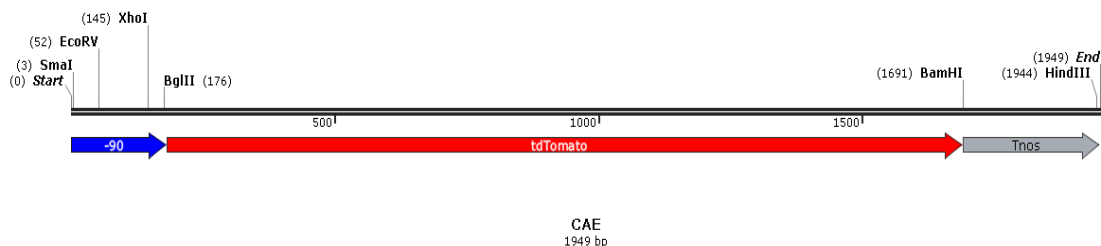
#### 4.1.4 Sequência e estrutura do CAE

A sequência do cassete artificial de expressão, obtida conforme descrito nos itens 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3, foi composta por um promotor básico derivado de modificações da região -90 do CAMV35S, pelo gene repórter *tdTomato-ER* e pelo terminador da nopalina sintase ( $T_{nos}$ ), conforme ilustrado na Figura 5.

CCCGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA CAAT CCCACTATGCTTGATATCCGCAAGACCCTTCCTC TATAAATA GGAAGTTCATTTTCAT  
 TTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAGATCCCAAAGGGCAATCAGATCT ATG AAAA  
 CTAATCTTTTCTTGTCTTATCTTTTCACTTCTTTTGTAGCTTAAAGCTCTGCAGAGTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTTCATCAAGAGTTC  
 ATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCAGAC  
 CGCCAAGTGAAGGTGACCAAGGGCGGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGC  
 ACCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACC  
 GTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAGCGTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAA  
 GAAGACGATGGGCTGGGAGGCGTCCACCAGCGCTGTACCCCGCGGAGGGCGTGTGAAGGGGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGAGC  
 GCGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTACATGGCGAAGAAGCCCGTGAACCTGCCCGGCTACTACTAGTGGACCAAGCTGGACATC  
 ACCTCCACACGAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCTGGGGCATGGCACCGGCAGCACC  
 CAGCGGCAGCTCCGGCACGCCTCCTCCGAGGACAACAACATGGCCGTTCATCAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGA  
 ACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGGCCCCCTG  
 CCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTC  
 CTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACCTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAGCG  
 TGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCCCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAGACGATGGGCTGGGAGGCGTCCACCAGGCGC  
 CTGTACCCCGCAGCGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACCAGGCCCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGACCATCTA  
 CATGGCGAAGAAGCCCGTCAACTGCCCGGCTACTACTAGTGGACACCAAGCTGGACATCACCTCCACACGAGGACTACACCATCGTGGAAC  
 AGTACGAGCGCTCCGAGGGCCGCCACCCTGTTCCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGCATGACGAGTTG TAA GGATCCAACATTTGGC A  
ATAA AGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATG  
 TAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAA  
 CTAGGATAAATATCGCGCGGTTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAAGCTT

**Figura 5: Sequência básica do CAE (1.949 pb).** Na cor azul está representado o promotor básico do CAE derivado da região -90 a +1 do CaMV35S (181 pb), destacados em quadros estão os elementos *cis* básicos CAAT-box e TATA-box; em vermelho está representada a sequência do gene repórter codificador da tdTomato-ER (1.509 pb), destacando-se em quadros os códons de início (ATG) e de término da tradução (TAA); e, em cinza, o terminador da nopalina sintase (259 pb), destacando-se o sinal de poliadenilação (AATAA) marcado com um quadro.

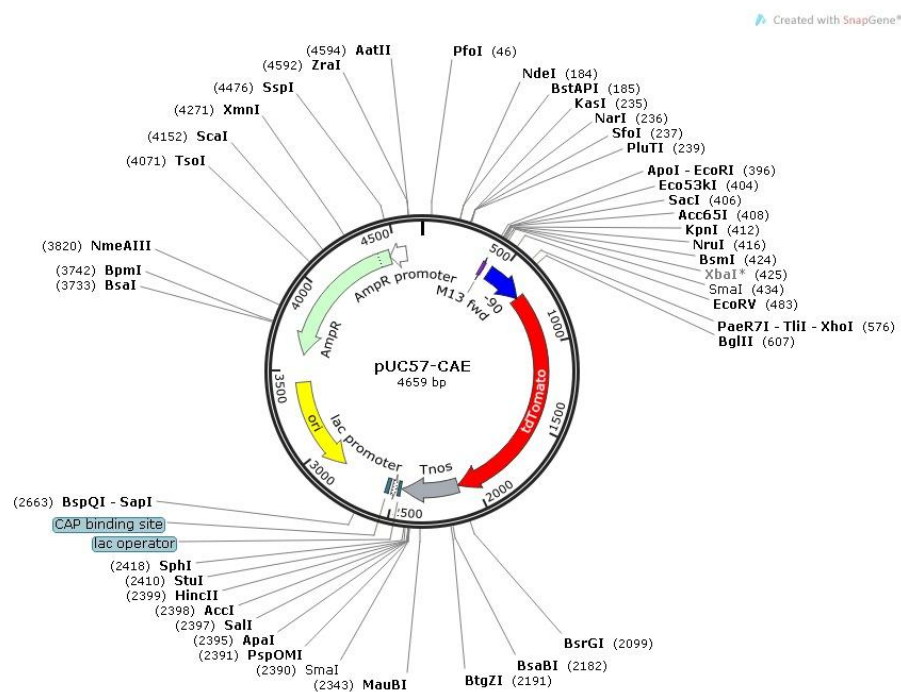
Com vistas a permitir a ligação de sequências promotoras e a substituição dos elementos codificadores e terminadores de DNA, sítios de restrição das endonucleases Smal, EcoRV, XhoI, BglII, BamHI e HindIII foram especificamente dispostos na sequência do CAE. Estes sítios de restrição foram criados nas posições 3, 52, 145, 176, 1.691 e 1.944, respectivamente (Figura 6). Os sítios para Smal e EcoRV localizados na região promotora básica foram particularmente selecionados por resultarem em extremidades cegas, permitindo a ligação e a avaliação de elementos *cis* de regulação da expressão gênica vegetal em ambas as orientações.



**Figura 6: Estrutura do CAE básico com representação de sítios de clivagem por endonucleases.** Figura produzida com o programa *Snap Gene* 2.7.1 a partir da sequência nucleotídica original. -90, promotor básico de CaMV35S (em azul); *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER* (em vermelho); *Tnos*, terminador da nopalina sintase (em cinza). Entre parênteses estão as posições dos sítios de restrição das endonucleases presentes na sequência do CAE.

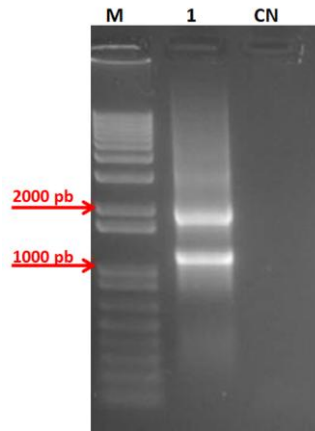
#### 4.2 Adaptação do CAE ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO

Conforme descrito no item 3.1, o CAE foi clonado no plasmídeo pUC57, resultando na versão pUC57-CAE representado na Figura 7.



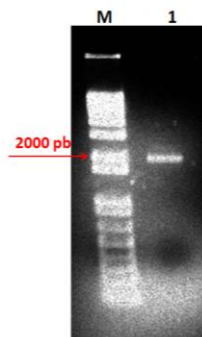
**Figura 7: Mapa do plasmídeo pUC57-CAE.** Imagem gerada com o programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências nucleotídicas originais do plasmídeo pUC57 (*GeneScript*) e do CAE. *M13fwd* e *M13rev*, sítios de anelamento dos *primers* *M13 forward* e *reverse* em relação ao sítio de multiclonagem; *ori*, sítio da origem de replicação; *lacZα*- gene repórter para β-galactosidase; *lac operator*, operador para a expressão de *lacZα*; *lac promoter*, promotor do operon *lac* de *E. coli*; *CAP binding site*, sítio de ligação da proteína ativadora do catabolismo CAP de *E. coli*; *Amp<sup>R</sup>*, gene *bla*, marcador para ampicilina; *AmpR promoter*, promotor do gene *bla*; *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, seqüência terminadora do gene codificador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.

Uma PCR foi realizada com pUC57-CAE utilizando *primers* especificamente projetados para a amplificação do CAE e adaptação do *amplicon* no plasmídeo pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Esta PCR resultou em uma banda de aproximadamente 2 kb, conforme esperado, e uma banda adicional com aproximadamente 1 kb (Figura 8). Esta banda adicional representa um provável produto do anelamento parcial dos *primers* utilizados na reação em regiões inespecíficas, as quais, provalmente fazem parte do próprio CAE.



**Figura 8:** Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pUC57-CAE com vistas a gerar o *amplicon* de CAE para subclonagem em pENTR/D-TOPO. *M*, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); *1*, *amplicon* de CAE resultante; *CN*, controle negativo.

Após nova eletroforese utilizando o volume total restante da PCR, a banda correspondente ao *amplicon* do CAE (1.949 pb) foi removida do gel de agarose e purificada. O fragmento de CAE purificado (Figura 9) foi quantificado em 20 ng/μL.



**Figura 9:** Imagem do gel resultante da eletroforese do produto de purificação da banda correspondente ao CAE. *M*, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); *1*, fragmento de CAE purificado.



A confirmação da integridade do CAE foi realizada pelo sequenciamento de DNA utilizando *primers* específicos e flanqueadores do mesmo (item 3.2.3). A sequência *forward* obtida neste sequenciamento cobriu uma região de 696 pb e, a *reverse*, 352 pb. O resultado do alinhamento realizado entre as sequências obtidas no sequenciamento e a sequência original do CAE permitiu concluir que o fragmento de 2 kb visualizado nos géis de agarose representava, de fato, o CAE (Figuras 10, 11 e 12).

```

CAE_      CCCGGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATGCTTGATATCCGCAA 60
2kb_      -----CCCAATCCCCTATGCTTGATATCCGCAA 29
          * .***** .*****

CAE_      GACCCTTCCTCTATAAATAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCA 120
2kb_      GACCCTTCCTCTATAAATAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCA 89
          *****

CAE_      GTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAGATCCCAAAGGGCAATCAGATC 180
2kb_      GTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAGATCCCAAAGGGCAATCAGATC 149
          *****

CAE_      TATGAAAATAATCTTTTCTTGTTCCTTATCTTTTCACTTCTTTTGAGCTTAAGCTCTGC 240
2kb_      TATGAAAATAATCTTTTCTTGTTCCTTATCTTTTCACTTCTTTTGAGCTTAAGCTCTGC 209
          *****

CAE_      AGAGTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTTCATCAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCG 300
2kb_      AGAGTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGTTCATCAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCG 269
          *****

CAE_      CATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCC 360
2kb_      CATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCC 329
          *****

CAE_      CTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGC 420
2kb_      CTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGC 389
          *****

CAE_      CTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGC 480
2kb_      CTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCGTACGTGAAGCACCCCGC 449
          *****

```

```

CAE_      CGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGAT 540
2kb_      CGACATCCCCGATTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGAT 509
          *****
CAE_      GAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAC 600
2kb_      GAACTTCGAGGACGGCGGTCTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCAC 569
          *****
CAE_      GCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCGACGGCCCGTAATGCA 660
2kb_      GCTGATCTACAAGGTGAAGATGCGCGGCACCAACTTCCCCCGACGGCCCGTAATGCA 629
          *****
CAE_      GAAGAAGACGATGGGCTGGGAGGCGTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGCT 720
2kb_      GAAGAAGACGATGGGCTGGGAGGCGTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGCT 689
          *****
CAE_      GAAGGGC 727
2kb_      GAAGGGC 696
          *****

```

**Figura 10: Alinhamento CAE (forward).** Alinhamento da sequência original do CAE (representada na figura pela sigla CAE) com a sequência *forward* obtida por sequenciamento do fragmento de 2 kb correspondente ao produto purificado da PCR do plasmídeo pUC57-CAE (representada na figura pela sigla 2 kb). Neste sequenciamento, utilizou-se o *primer forward CAEv2-5'*, cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleotídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.

```

CAE      AGCTGGACAT---CACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAAACAGTACGAGCGC 56
2kb      -GGGGGGCGAGGTGGACATCCCTCCCAGAGGAT--CACCAT-GTGGAAACAGTGGGGGGG 56
          *  **.*.:  **.***:*..*****  *****  *****.*.* *

CAE_     TCCGAGGGCCGCCACCACCTGTTCCTGTACGGCATGGACGAGCTGTACAAGCATGACGAG 116
2kb_     TGGGGGGCCGCCACCACCTGTTCCTGTACGGCATGGACGGGGTGTACAAGCATGACGAG 116
          *  *.*****.* *****.* *****

CAE      TTGTAAGGATCCAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT 176
2kb      TTGTAAGGATCCAACATTTGGCAATAAAGTTTGTTAAGAGTGAATCCTGTTGCCGTCTT 176
          *****  *****  *****  *****

CAE_     GCGATGATTATCATATAATTTCTGTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAA 236
2kb_     GCGATGATTATCATATAATTTCTGTGAATTAGGTTAAGCATGTAGTAATTAACATGTAA 236
          *****  *****.* *****

CAE_     TGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAA 296
2kb_     GGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATACATTTAA 296
          *****

CAE_     TACCGGATAGAAAAAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCA 356
2kb_     TACCGGATAGAAAAAAAATATAGCGCGCAAAGTAGGATAAATATCGCGCGC----- 349
          *****

```

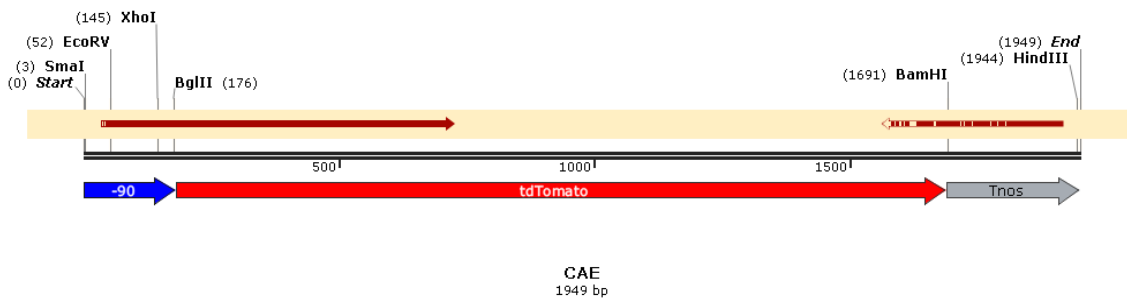
```

CAE          TCTATGTTACTAGATCGGGAAGCTT 381
2kb          -----CGG----- 352
                ***

```

**Figura 11: Alinhamento CAE (reverse).** Alinhamento da sequência original do CAE (representada na figura pela sigla CAE) com a sequência *reverse* obtida por sequenciamento do fragmento de 2 kb correspondente ao produto purificado da PCR do plasmídeo pUC57-CAE (representada na figura pela sigla 2 kb). Neste sequenciamento, utilizou-se o *primer reverse* CAEv2-3', cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleotídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.

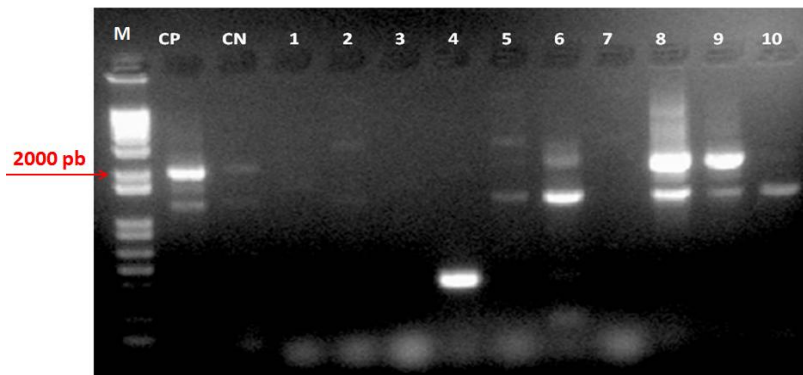
Created with SnapGene®



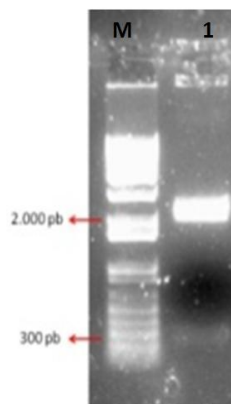
**Figura 12: Mapa de cobertura do sequenciamento do CAE.** Imagem gerada com o programa SnapGene 2.7.1 a partir da sequência nucleotídica original do CAE e as sequências representadas pela sigla 2 kb nas Figuras 10 e 11. As setas vermelhas superiores representam os segmentos do CAE cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido indica o *primer* utilizado em cada um dos eventos. *Primer forward* CAEv2-5', para direita e *primer reverse* CAEv2-3', para esquerda. Os segmentos brancos no interior das setas vermelhas superiores indicam lacunas (do inglês, *gaps*) e inconsistências (do inglês, *mismatches*) identificados no alinhamento.

A clonagem do CAE purificado em pENTR/D-TOPO foi realizada conforme descrito no item 3.2.4 e a transformação de células de *E. coli* OmniMAX 2 resultou em aproximadamente 20 colônias que foram selecionadas com o antibiótico canamicina a 50 mg/L. Destas, 10 colônias foram inoculadas para a minipreparação de plasmídeos para confirmação da inserção do CAE em pENTR/D-TOPO por PCR. Apenas os plasmídeos preparados a partir das colônias identificadas pelos números 6, 8 e 9 resultaram em amplificação do fragmento conforme o tamanho esperado (Figura 13). A minipreparação plasmidial número 9 foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. A confirmação da presença do CAE nesta preparação plasmidial também foi realizada por meio de reação de clivagem com as

endonucleases EcoRV e HincII, resultando em tamanhos de bandas coerentes com o esperado, isto é, 2.264, 2.026 e 239 pb, conforme ilustrado na Figura 14.

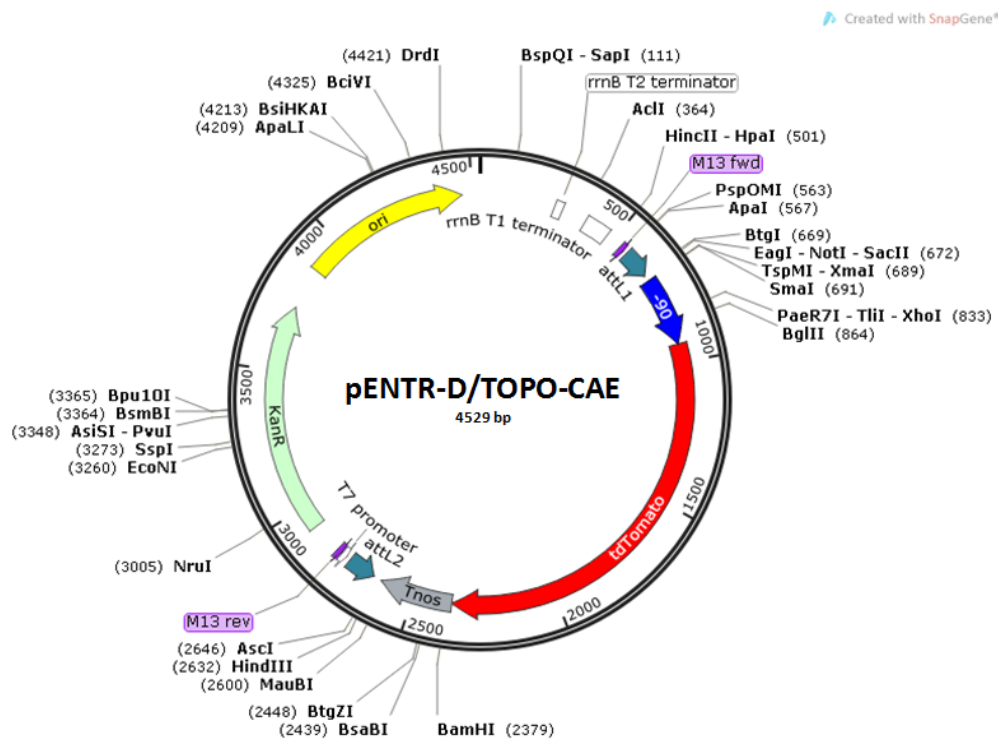


**Figura 13: Imagem do gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem do CAE em pENTR/D-TOPO.** Primers específicos ao fragmento de 1.949 pb foram utilizados na reação. A presença de banda deste tamanho permitiu identificar como clones positivos as preparações número 6, 8 e 9. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com a adição de pUC57-CAE como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-10, plasmídeos minipreparados a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX 2 transformadas com o produto de ligação do CAE ao pENTR/D-TOPO.

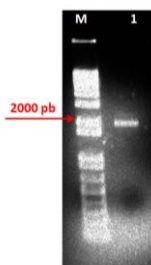


**Figura 14: Imagem do gel de agarose resultante de reação de clivagem da preparação número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE com EcoRV e HincII.** O tamanho das bandas visíveis está de acordo com o esperado, isto é, 2,3, 2 e 0,24 kb. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, ipreparação número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE clivada com *EcoRV* e *HincII*.

Assim, seguiu-se com a purificação do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE proveniente da colônia número 9 objetivando obter as condições de pureza necessárias para a recombinação deste plasmídeo com o plasmídeo binário pKGW (KARIMI *et al.*, 2002). Na Figura 15 está representado o mapa da versão pENTR/D-TOPO-CAE gerada. O plasmídeo purificado (Figura 16) foi quantificado em 157,2 ng/ $\mu$ L.



**Figura 15: Mapa do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE.** Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen) e CAE. *M13fwd* e *M13rev*, posições de anelamento dos *primers M13 forward* e *reverse* em relação ao sítio de recombinação; *T7*, região promotora T7 para transcrição de insertos; *attL2* e *attL1*, sítios de recombinação específica do sistema *Gateway*; *rrnB T1* e *T2 terminator*, sequências terminadoras do gene *rrnB* para controle da transcrição de insertos; *Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador para canamicina; *ori*, sítio da origem de replicação; *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, sequência terminadora do gene codificador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.



**Figura 16:** Imagem do gel de agarose resultante da purificação do plasmídeo número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, alíquota da solução do plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE purificado.

Novo sequenciamento de DNA foi realizado utilizando-se *primers* especificamente projetados para anelar seqüências internas do CAE e direcionados às extremidades 5' e 3' do CAE (item 3.2.10). O alinhamento realizado entre as seqüências obtidas no novo sequenciamento permitiu verificar a orientação dos sítios de integração do CAE no plasmídeo proveniente da preparação número 9 e a seqüência do pENTR/D-TOPO-CAE. Como conclusão, o CAE foi clonado no vetor pENTR/D-TOPO de forma correta, isto é, na orientação senso e sem qualquer alteração de nucleotídeos, conforme ilustrado nas Figuras 17, 18 e 19.

```

pENTR.CAE:      GTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGA
Forward:        -----CTAATTTCTTGTGA
                **  *  *****

pENTR.CAE:      ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT
Forward:        ATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT
                *****

pENTR.CAE:      TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCG
Forward:        TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCG
                *****

pENTR.CAE:      CAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAAGCTTAAG
Forward:        CAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGAAGCTTAAG
                *****

pENTR.CAE:      GGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTA
Forward:        GGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATAAGAAAGCATTGCTTA
                *****

pENTR.CAE:      TCAATTTGTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCA
Forward:        TCAATTTGTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCA
                *****

pENTR.CAE:      GCTGATATCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGG
Forward:        GCTGATATCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGG
                *****

```

```

pENTR.CAE:      CCGGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACA
Forward:        CCGGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACA
*****

pENTR.CAE:      ATAAAACGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCACCGG
Forward:        ATAAAACGTCTGCTTACATAAACAGTAATAACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCACCGG
*****

pENTR.CAE:      GAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGG
Forward:        GAAACGTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGG
*****

pENTR.CAE:      GCTCGGATAATGTCTGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGATGGGAAGCCCGAT
Forward:        GCTCGGATAATGTCTGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGATGGGAAGCCCGAT
*****

pENTR.CAE:      GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAG
Forward:        GCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAG
*****

pENTR.CAE:      ATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATC
Forward:        ATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTCCGACCATCAAGCATTTTATC
*****

pENTR.CAE:      CGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGG--AAAAACAGCATTTCCA
Forward:        CGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGGAAAAACAGCATTTCCA
*****

pENTR.CAE:      GGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAATATTG-TTGATGCGCTGGCAGTGTTC
Forward:        GGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAG-TGAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTC
*****

pENTR.CAE:      TGCGCCGGTTGCATTCGATTCTCTGTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTC
Forward:        TGCGCCGGTTGCATTCGATTCTCTGTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTC
*****

pENTR.CAE:      GTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGAATTTGATG
Forward:        GTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACCGATGTGGCTTGAATGTCGAGAGTGAAT
*****

pENTR.CAE:      ACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGAAAGAAATGCATAAACTTTGCCAT
Forward:        TAGA-----
**

```

**Figura 17: Alinhamento pENTER/D-TOPO-CAE (forward).** Alinhamento da sequência parcial de pENTR/D-TOPO-CAE (representada pela sigla pENTR.CAE) com a sequência *forward* resultante do sequenciamento da preparação número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE (representada pela palavra *Forward*). Neste sequenciamento, utilizou-se o *primer forward* CAEv2-For1730, cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleótídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.

```

pENTR.CAE_      -----
Reverse_        GAGAGGGTCGAATTTTGTGGGAGTGTCTCGTTCAGGGGGGCGATGCTTATTGAAAATAT 60

pENTR.CAE_      -----CT 2
Reverse_        CGCCAGCAACGCGGCCCTTTACGGTTCCTGGCTTTTGTGCTTTTGTCAACATGTTCT 120
**

pENTR.CAE_      TTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA 62
Reverse_        TTCTGCGGTAT-CCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA 179
*****

pENTR.CAE_      CCGTCGCCCAGCCGAACG-ACCGAGCGCAGGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG 121
Reverse_        CCGCTCGCCCAGCCGAACGACCGAGCGCAGGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAA-AG 238
*****

pENTR.CAE      CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGGCAC 181
Reverse        CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGGCAC 298
*****

```

```

pENTR.CAE      GACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCT 241
Reverse        GACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATACGCGTACCGCT 358
*****

pENTR.CAE_    AGCCAGGAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAG 301
Reverse_      AGCCAGGAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGGCCATCCGTCAGGATGGCCTTCTGCTTAG 418
*****

pENTR.CAE_    TTTGATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCGCCACCCCTCCGGGCCGTTGCTTCA 361
Reverse_      TTTGATGCCTGGCAGTTTATGGCGGGCGTCTGCCCGCCACCCCTCCGGGCCGTTGCTTCA 478
*****

pENTR.CAE     CAACGTTCAAATCCGCTCCCGGGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAAC 421
Reverse       CAACGTTCAAATCCGCTCCCGGGGATTTGTCTACTCAGGAGAGCGTTCACCGACAAAC 538
*****

pENTR.CAE_    AACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCCTGG 481
Reverse_      AACAGATAAAACGAAAGGCCAGTCTTCCGACTGAGCCTTTCGTTTTATTGATGCCTGG 598
*****

pENTR.CAE_    CAGTTCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA 541
Reverse_      CAGTTCCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAA 658
*****

pENTR.CAE_    ACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACC 601
Reverse       ACGACGGCCAGTCTTAAGCTCGGGCCCAATAATGATTTTATTTGACTGATAGTGACC 718
*****

pENTR.CAE_    TGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAA 661
Reverse_      TGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGCTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAA 778
*****

pENTR.CAE     GCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCCCGGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA 721
Reverse_      GCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCC--GGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA 836
*****

pENTR.CAE_    CAATCCCACTATGCTTGATATCCGCAAGACCCTTCCCTATAAATAGGAAGTTCATTCA 781
Reverse_      CAATCCCACTATGCTTGATATCCGCAAGACCCTTCCCTATAAATAGGAAGTTCATTCA 896
*****

pENTR.CAE     TTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTT 841
Reverse_      TTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTACAA----- 938
*****

pENTR.CAE     TCGCAGATCCCAAAGGCAATCAGATCTATGAAACTAATCTTTTCTTGTTTCTATCTT 901
Reverse_      -----A 939
:

pENTR.CAE_    TTCACTTCTTTGAGCTTAAGCTCTGCAGAGTTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGTCAT 961
Reverse_      TTCACTTCTTTCAACC----- 956
***.*** ** *.

pENTR.CAE     CAAAGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCATGAACGGCCACGAGTTCGA 1021
Reverse_      -----

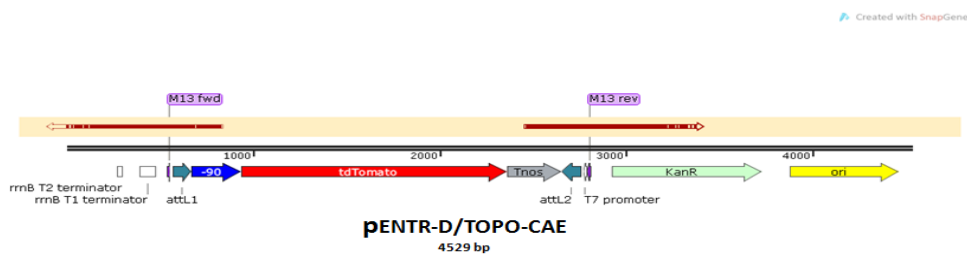
pENTR.CAE_    GATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGTGAAGGT 1081
Reverse_      -----

pENTR.CAE_    GACCAAGGGCGGCCCTGCCTTCGCTGGGACATCTGTCCCCAGTTCATGTACGG 1141
Reverse_      -----

```

**Figura 18: Alinhamento pENTER/D-TOPO-CAE (reverse). Alinhamento da sequência parcial de pENTR/D-TOPO-CAE (representada pela sigla pENTR.CAE) com a sequência *reverse* resultante do sequenciamento da preparação número 9 de pENTR/D-TOPO-CAE (representada pela palavra *reverse*). Neste sequenciamento, utilizou-se o *primer reverse* CAEv2-Rev155, cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleotídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.**

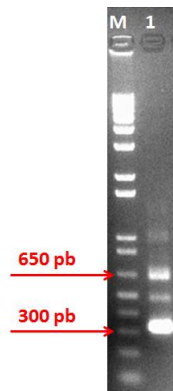




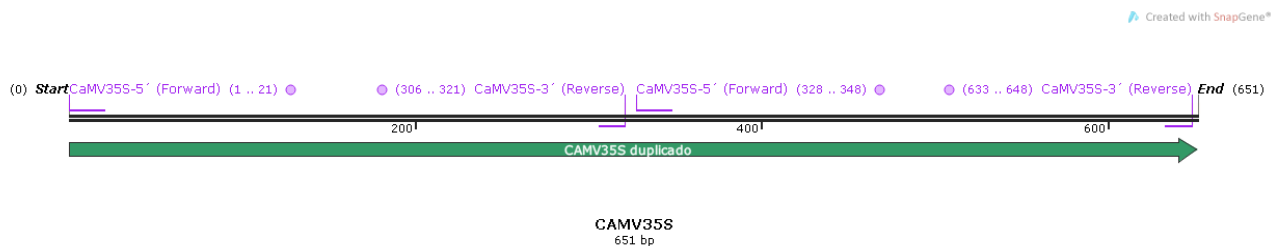
**Figura 19: Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-CAE.** Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), do CAE, e das sequências representadas pelas palavras *forward* e *reverse* nas figuras 17 e 18. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pENTR/D-TOPO-CAE cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido indica o *primer* utilizado em cada um dos eventos. *Primer forward* CAEv2-For1730, para direita e *primer reverse* CAEv2-Rev155, para esquerda. Os segmentos brancos no interior das setas vermelhas superiores indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

#### 4.3 Adaptação do CaMV35S ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO-CAE

A fim de gerar uma versão do CAE com promotor forte e constitutivo, de forma a servir de controle positivo em experimentos de avaliação de promotores e elementos *cis*, o promotor CAMV35S completo, representado em versão duplicada no plasmídeo pCAMBIA2300 (CAMBIA), foi amplificado por PCR a partir deste. Nesta PCR, foram utilizados *primers* especificamente projetados para flanquear a sequência do CaMV35S (item 3.2.11). A PCR permitiu produzir uma banda de aproximadamente 650 pb, conforme esperado, e uma banda adicional com aproximadamente 300 pb, conforme ilustrado na Figura 20. Esta banda adicional de 300 pb também era esperada, uma vez que o CaMV35S clonado em pCAMBIA2300 está duplicado e, portanto, os *primers* utilizados na PCR anelaram-se tanto nas regiões externas quanto internas do promotor (Figura 21).

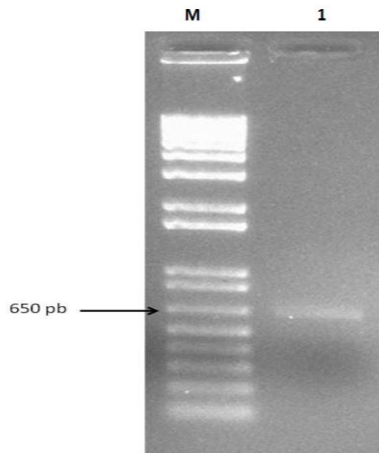


**Figura 20:** Imagem do gel resultante da eletroforese do produto da PCR do plasmídeo pCAMBIA2300 com vistas a gerar o *amplicon* do CaMV35S duplicado para subclonagem em pENTR/D-TOPO-CAE. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, amplicon do CaMV35S duplicado resultante.



**Figura 21:** Posições de anelamento dos *primers* CaMV35S-5' e CaMV35S-3' no CaMV35S duplicado originário de pCAMBIA2300. Imagem gerada com o programa *SnapGene* 2.7.1 a partir da sequência nucleotídica original do CaMV35S duplicado de pCAMBIA2300 (CAMBIA) e das sequências dos *primers* CaMV35S-5' e CaMV35S-3'.

Após nova eletroforese, a banda correspondente ao CaMV35S duplicado (650 pb) foi removida do gel de agarose e purificada. O DNA purificado (Figura 22) foi quantificado em 5,6 ng/μL.



**Figura 22:** Imagem do gel resultante da eletroforese do produto de purificação da banda correspondente ao CaMV35S duplicado. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, CAMV35S duplicado purificado.

A confirmação da integridade do CaMV35S duplicado e purificado foi realizada pelo sequenciamento de DNA utilizando *primer* específico e flaqueador direto do mesmo. A sequência *forward* obtida nesse sequenciamento cobriu uma região de 642 pb. O resultado do alinhamento realizado entre a sequência obtida no sequenciamento e a sequência original do CaMV35S contido em pCAMBIA2300 permitiu concluir que o fragmento de aproximadamente 0,6 kb visualizado nos géis de agarose representava, de fato, o CaMV35S duplicado (Figuras 23 e 24).

```

CaMV35S_      ATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGAC 60
F_            -----CTGATCTACTCCAG--ATATCAAG-ATACAGTCTCAGAAGAC 39
              ** .*****. *****. *****. *****.*****

CaMV35S_      CAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCAT 120
F_            CAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCAT 99
              *****

CaMV35S_      TGCCCAGCTATCTGTCACTTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAA 180
F_            TGCCCAGCTATCTGTCACTTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAA 159
              *****

CaMV35S_      TGCCATCATTCGCATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC 240
F_            TGCCATCATTCGCATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCC 219
              *****

CaMV35S      AAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCAGTCT 300
F_            AAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCCAGTCT 279
              *****

```

```

CaMV35S      TCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGCACTCTCGTCTACTCCAAG 360
F            TCAAAGCAAGTGGATT-TGATGTAATAATGGTGGAGCAGCACTCTCGTCTACTCCAAG 338
*****      : .*:.*:*****

CaMV35S_    AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGTA 420
F_          AATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGTA 398
*****

CaMV35S_    ATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACA 480
F_          ATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACA 458
*****

CaMV35S_    GTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTT 540
F_          GTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTT 518
*****

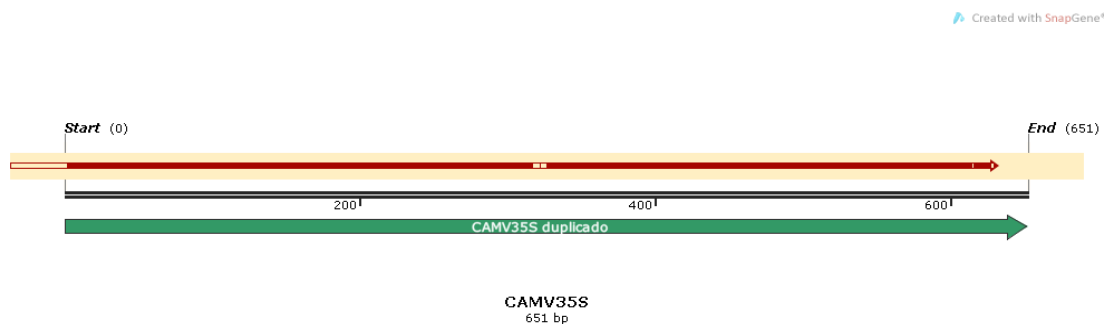
CaMV35S_    CAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTG 600
F_          CAAGATGACTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTG 578
*****

CaMV35S     GAAAAAGAAGACGTTCCAACCAAGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAT----- 651
F_          GAAAAAGAAGACGTTCCAACCAAGTCTTCAAAGCAGTGGATTGAAGTAGTAGAGGGG 638
*****

CaMV35S_    ---
F_          GGAA 642

```

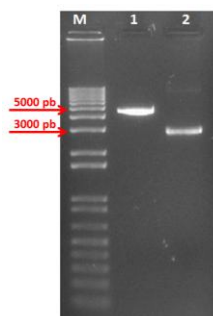
**Figura 23: Alinhamento CaMV35S (forward).** Alinhamento da sequência original do CaMV35S duplicado contido em pCAMBIA2300 (representada na figura pela sigla CaMV35S) com a sequência *forward* obtida por sequenciamento do fragmento de 650 pb correspondente ao produto purificado da PCR do plasmídeo pCAMBIA2300 (representada na figura pela letra F). Nesse sequenciamento utilizou-se o *primer forward* CaMV35S-5', cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada na figura. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleotídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.



**Figura 24: Mapa de cobertura do sequenciamento do CaMV35S duplicado.** Imagem gerada com o emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir da sequência nucleotídica original do CaMV35S duplicado e da sequência representada pela letra F na figura 23. A seta vermelha representa o segmento do CaMV35S duplicado coberto pelo sequenciamento realizado e o sentido indica o *primer* utilizado nesse evento. *Primer forward* CaMV35S-5' para direita. Os segmentos brancos no interior da seta vermelha indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

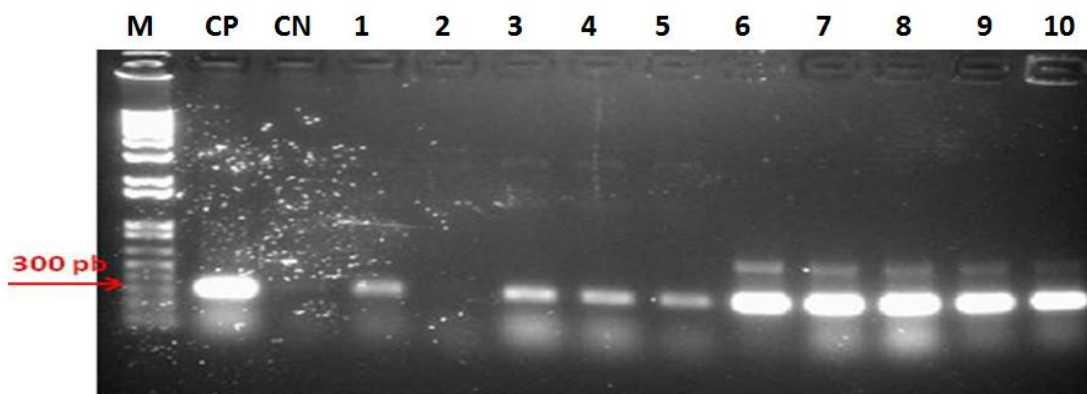
Realizou-se clivagem de pENTR/D-TOPO-CAE com *SmaI* para a adaptação do *amplicon* do CaMV35S duplicado. Esta clivagem resultou em banda de tamanho

coerente com o esperado (4.529 pb). Um único fragmento de aproximadamente 4,5 kb foi observado em gel de agarose submetido à eletroforese, representando a linearização do plasmídeo (Figura 25).

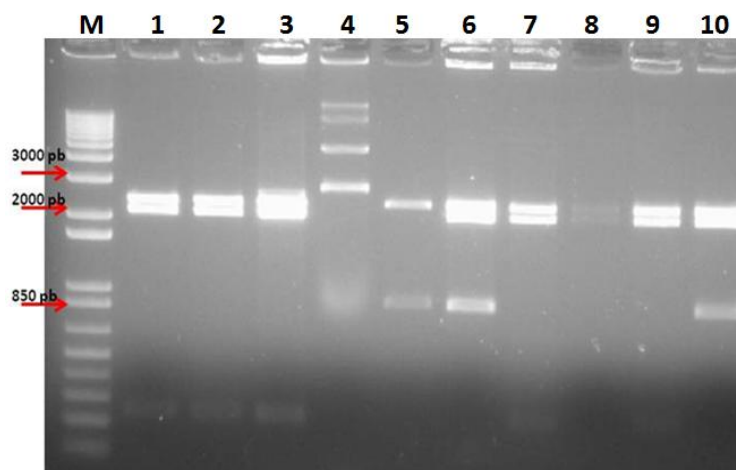


**Figura 25: Imagem de gel resultante da eletroforese da reação de clivagem de pENTR/D-TOPO-CAE com SmaI.** M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, pENTR/D-TOPO-CAE SmaI-cut; 2, pENTR/D-TOPO-CAE não clivado.

A ligação do CaMV35S duplicado em pENTR/D-TOPO-CAE foi realizada e a transformação de células de *E. coli* OmniMAX 2 resultou em diversas colônias que foram selecionadas com o antibiótico canamicina a 50 mg/L. Destas, 10 colônias foram inoculadas para a minipreparação de plasmídeos e posterior confirmação da inserção do CaMV35S por PCR. Apenas o plasmídeo preparado a partir da colônia identificada pelo número 2 não resultou em amplificação do fragmento conforme o tamanho esperado (Figura 26). A verificação da presença do CaMV35S nesta minipreparação e nas outras 9 também foi realizada por meio de reação de clivagem com as endonucleases EcoRV e HincII. Observou-se tamanho de bandas coerente com o esperado para a clivagem, isto é, 2.264, 2.026 e 890 pb, apenas nas preparações identificadas pelos números 6 e 10 (Figura 27). Escolheu-se a colônia 6 para dar continuidade ao trabalho.

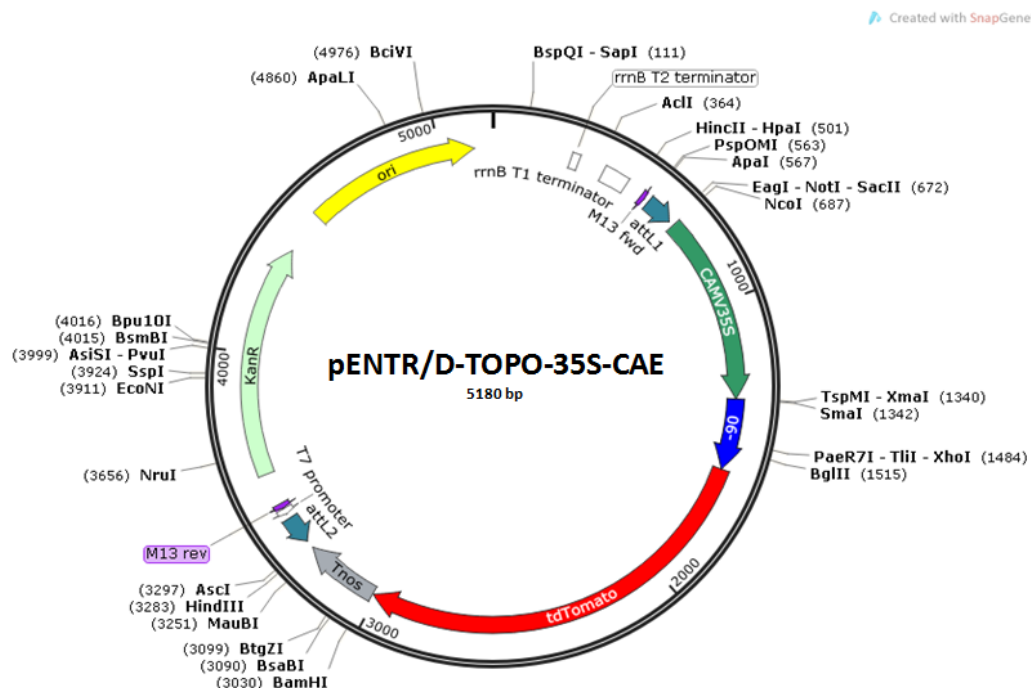


**Figura 26: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem do CaMV35S em pENTR/D-TOPO-CAE.** *Primers* específicos ao CaMV35S simples (325 pb) foram utilizados na reação. A presença de banda de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como clones positivos todas as preparações analisadas, exceto a número 2. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com adição de pCAMBIA2300 como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, resto da mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-10, plasmídeos pENTR/D-TOPO-35S-CAE minipreparados a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX 2 transformadas com o produto de ligação do CaMV35S ao pENTR/D-TOPO-CAE.

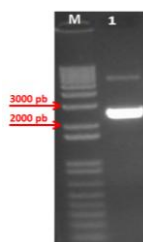


**Figura 27: Imagem de gel resultante da eletroforese de reação de clivagem de 10 preparações de pENTR/D-TOPO-35S-CAE com *EcoRv* e *HincII*.** Tamanho das bandas visíveis nas amostras identificadas pelos números 6 e 10 está de acordo com o esperado. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA *O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas); 1-10, plasmídeos pENTR/D-TOPO-35S-CAE preparados a partir de colônias de *E. coli* OmniMAX 2 transformadas com o produto de ligação do CaMV35S ao pENTR/D-TOPO-CAE.

À semelhança do que foi realizado com o plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE, seguiu-se com a purificação do plasmídeo pENTR/D-TOPO-35S-CAE (Figura 28) proveniente da colônia identificada pelo número 6 para obter as condições de pureza necessárias para a recombinação com o plasmídeo binário pKGW (KARIMI *et al.*, 2002). O plasmídeo purificado resultante (Figura 29) foi quantificado em 214,7 ng/μL.



**Figura 28: Mapa do plasmídeo pENTR/D-TOPO-35S-CAE.** Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), do CaMV35S originário de pCAMBIA2300 (CAMBIA) e do CAE. *M13fwd* e *M13rev*, posições de anelamento dos primers *M13 forward* e *reverse* em relação ao sítio de recombinação; *T7*, região promotora T7 para transcrição de insertos; *attL2* e *attL1*, sítios de recombinação específica do sistema *Gateway*; *rrnB T1* e *T2 terminator*, seqüências terminadoras do gene *rrnB* para controle da transcrição de insertos; *Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador para canamicina; *ori*, sítio da origem de replicação; CAMV35S, promotor CaMV35S duplicado originário de pCAMBIA2300; -90, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, seqüência terminadora do gene codificador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.



**Figura 29: Imagem de gel resultante da eletroforese do produto de purificação da preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE.** M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE purificada.

Novamente, a integridade, a orientação e a localização do fragmento correspondente ao CaMV35S duplicado em pENTR/D-TOPO-CAE foram confirmadas por sequenciamento de DNA empregando-se *primers* especificamente projetados (item 3.2.20). O alinhamento realizado entre a sequência obtida no sequenciamento do CaMV35S no plasmídeo proveniente da minipreparação número 6 e a sequência do pENTR/D-TOPO-35S-CAE correspondente à região coberta pelo sequenciamento permitiu concluir que o CaMV35S foi clonado no sítio de SmaI do vetor pENTR/D-TOPO-CAE de forma correta, isto é, na orientação senso, conforme ilustrado nas Figuras 30 e 31.

```

1_ -----AGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACC 30
2_ GGTCCCAAAGATGGACCCCAACCACGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACC 60
                                     *****

1_ ACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATAACATGGTGGAGCAGCAGACTCTCGTCTAC 90
2_ ACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTG--AACATGGTGGAGCAGCAGACTCTCGTCTAC 118
*****

```



```

1_      TCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAA 150
2_      TCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAA 178
      *****

1_      AGGGTAATATCGGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAA 210
2_      AGGGTAATATCGGGAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAA 238
      *****

1_      AGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCT 270
2_      AGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCT 298
      *****

1_      ATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC 330
2_      ATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAACCCACGAGGAGC 358
      *****

1_      ATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATCCC 390
2_      ATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTAGT--- 415
      ***** . . *

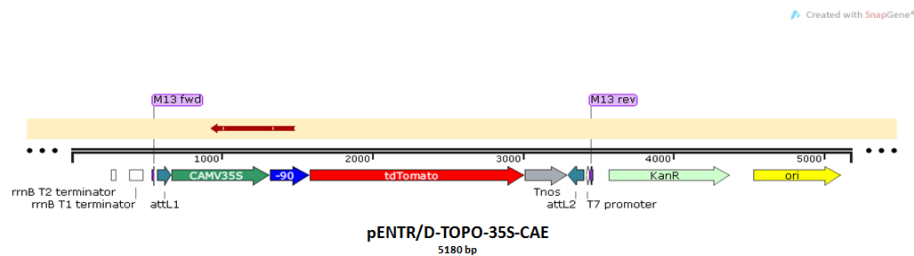
1_      GGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATGCTTGATATCCGCAAGAC 450
2_      GGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATGCTTGATATCCGCAAGAC 475
      *****

1_      CCTTCCTCTATAAATAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTC 510
2_      CCTTCCTCTATAAATAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTC 535
      *****

1_      TCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCGAGCTTTCGCAGATCCCAAAGGGCAATCA 563
2_      TCTCTCTACAAATCCTATTTTCCCAAGC----- 563
      ***** : : * * * .***

```

**Figura 30: Alinhamento pENTR/D-TOPO-35S-CAE (reverse).** Alinhamento da sequência de parcial de pENTR/D-TOPO-35S-CAE (representada na figura pelo número 1) com a sequência *reverse* obtida por sequenciamento da preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE (representada na figura pelo número 2). Nesse sequenciamento utilizou-se o *primer reverse* CAEv2-Rev155, cuja posição de anelamento encontra-se sublinhada na figura. Os asteriscos (\*) representam regiões de total identidade de nucleotídeos, e os pontos (.) erros de pareamento.



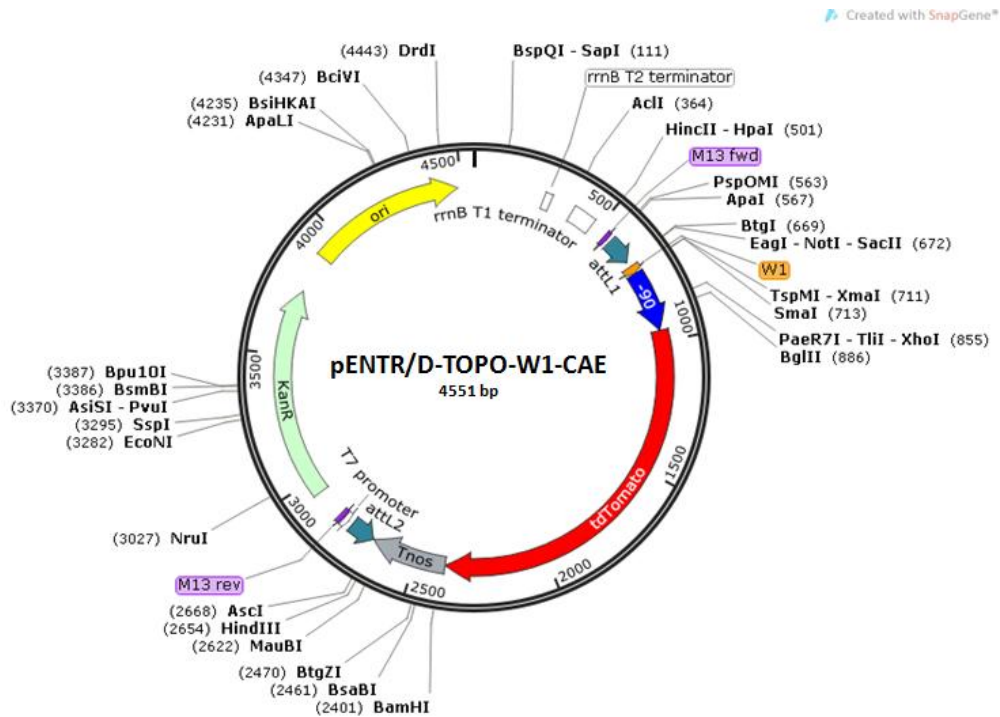
**Figura 31: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 6 de pENTR/D-TOPO-35S-CAE.** Imagem gerada com o programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), do CaMV35S originário de pCAMBIA2300 (CAMBIA), do CAE, e da sequência representada pelo número 2 na figura 30. A seta vermelha superior representa o segmento de pENTR/D-TOPO-35S-CAE coberto pelo sequenciamento realizado e o sentido indica o *primer* utilizado nesse evento. *Primer reverse* CAEv2-Rev155, para esquerda. Os segmentos brancos no interior da seta vermelha superior indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

#### 4.4 Ligação de adaptadores de DNA correspondentes a elementos *cis* ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO-CAE

A fim de avaliar experimentalmente a possibilidade de elementos *cis* específicos direcionarem a transcrição de *td-Tomato-ER* em órgãos como sementes, tecidos vasculares (xilema) e raízes, os elementos W1, AC e RHE foram selecionados a partir da literatura científica. Os mesmos foram recebidos na forma de *primers* de fita simples e submetidos à desnaturação e renaturação conforme descrito no item 3.2.21 de Material & Métodos. Desta forma, promoveu-se o anelamento de *primers* complementares para a formação de adaptadores de fitas duplas de DNA e ligação destes elementos no plasmídeo pENTR/D-TOPO-CAE. A clonagem de uma cópia do elemento W1 no sítio de *SmaI* de pENTR/D-TOPO-CAE foi realizada conforme descrito no item 3.2.22. Também foram realizadas reações individuais para a ligação de uma cópia do elemento AC e uma cópia de RHE no sítio de *SmaI* de pENTR/D-TOPO-CAE (item 3.2.22). Células de *E. coli* OmniMAX 2 foram transformadas com pENTR/D-TOPO-W1-CAE (Figura 32), pENTR/D-TOPO-AC-CAE (Figura 35) e pENTR/D-TOPO-RHE-CAE. Cada uma destas transformações resultou em diversas colônias que foram selecionadas com o antibiótico canamicina a 50

mg/L. Dezesesseis colônias de cada transformação foram preparadas e submetidas ao sequenciamento com o objetivo de verificar se os elementos *cis* haviam sido corretamente ligados em pENTR/D-TOPO-CAE.

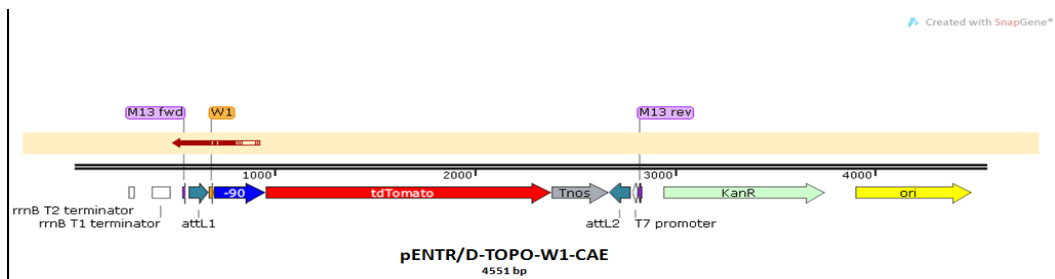
As análises individuais das sequências das preparações de pENTR/D-TOPO-W1-CAE obtidas nos sequenciamentos (Figuras 33 e 34) permitiram concluir que apenas a minipreparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE apresentava o elemento W1 clonado corretamente, isto é, na orientação senso e sem qualquer alteração em sua sequência nucleotídica. Na Figura 33 está representada a sequência obtida no sequenciamento realizado a partir desta minipreparação. Nesta mesma figura, destaca-se a sequência do elemento W1, ligado na orientação senso.



**Figura 32: Mapa do plasmídeo pENTR/D-TOPO-W1-CAE.** Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), W1 e CAE. *M13fwd* e *M13rev*, posições de anelamento dos primers *M13 forward* e *reverse* em relação ao sítio de recombinação; *T7*, região promotora *T7* para transcrição de insertos; *attL2* e *attL1*, sítios de recombinação específica do sistema *Gateway*; *rrnB T1* e *T2 terminator*, sequências terminadoras do gene *rrnB* para controle da transcrição de insertos; *Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador para canamicina; *ori*, sítio da origem de replicação; *W1*, elemento *cis* W1 regulador da expressão de genes vegetais; *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, sequência terminadora do gene codificador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.

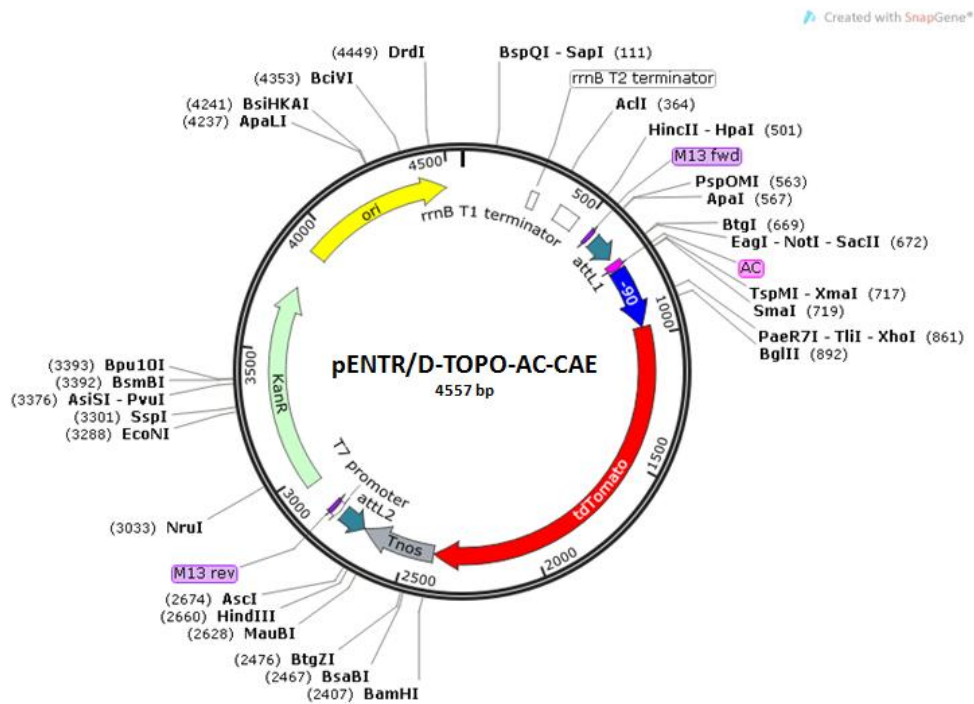
```
CCTACTCTCGCGTTAACGCTAGCATGGATGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTAAG
CTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTGACTGATAGTGACCTGTTCGTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC
TTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTCACCCGACACGTAGAATGA
GTCATCACGGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATGCTTGATATCCGCAAGACCCCTT
CCTCTATAAATAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACACGCGAAATCACCATCTCTCTCAAATCTTTTCTTG
AAAT
```

**Figura 33: Sequência de 364 pb obtida por sequenciamento da preparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE.** Neste sequenciamento, foi utilizado o *primer reverse* CAEv2-Rev155 (item 3.2.25). O elemento *cis* W1 na orientação *senso* encontra-se destacado por uma caixa. Sublinhado está o sítio de restrição da endonuclease *SmaI*, o qual foi interrompido pela inserção de W1.



**Figura 34: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE.** Imagem gerada com o programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências nucleotídicas originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), do elemento *cis* W1, do CAE e da sequência apresentada na figura 33. A seta vermelha superior representa o segmento de pENTR/D-TOPO-W1-CAE coberto pelo sequenciamento realizado e o sentido indica o *primer* utilizado nesse evento. *Primer reverse* CAEv2-Rev155, para esquerda. Os segmentos brancos no interior da seta vermelha superior indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

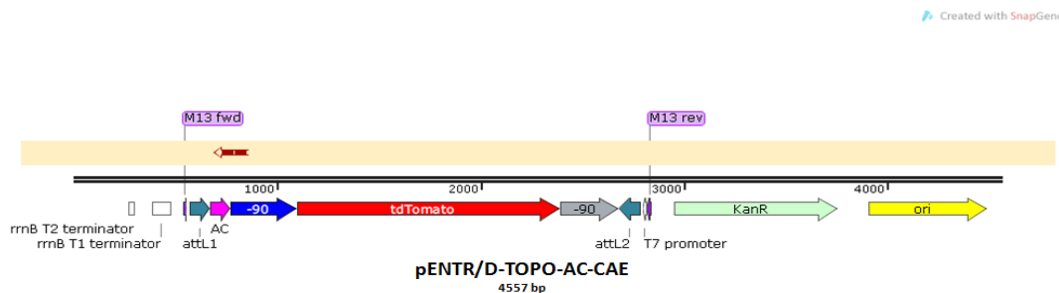
As análises das sequências resultantes das preparações de pENTR/D-TOPO-AC-CAE obtidas nos sequenciamentos (Figuras 36 e 37) mostraram que foram obtidos quatro plasmídeos com o elemento AC clonado corretamente (números 7, 12, 14 e 15). Na Figura 36 está representada a sequência obtida no sequenciamento realizado a partir da preparação plasmidial número 12, a qual foi escolhida para dar continuidade ao trabalho. Nesta mesma Figura, destaca-se a sequência do elemento AC, ligado na orientação senso.



**Figura 35: Mapa do plasmídeo pENTR/D-TOPO-AC-CAE.** Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências de nucleotídeos originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), AC e CAE. *M13fwd* e *M13rev*, posições de anelamento dos *primers M13 forward* e *reverse* em relação ao sítio de recombinação; *T7*, região promotora *T7* para transcrição de insertos; *attL2* e *attL1*, sítios de recombinação específica do sistema *Gateway*; *rrnB T1* e *T2 terminator*, seqüências terminadoras do gene *rrnB* para controle da transcrição de insertos; *Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador para canamicina; *ori*, sítio da origem de replicação; *AC*, elemento *cis AC* regulador da expressão de genes vegetais; *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, seqüência terminadora do gene codificador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.

TCACCCACCTACCACCTACCACCAACCACCAACCGGGATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCA  
 CTATGCTTGATATCCGCAAGACCCTTCCCTATAAATAGGAAGTTCATTTTGGAGAGGACACGCTGAAA  
 TCACCAGTCTCTCTCTACAAAATTTGG

**Figura 36: Sequência de 171 pb obtida por sequenciamento da preparação número 12 de pENTR/D-TOPO-AC-CAE.** Nesse sequenciamento foi utilizado o *primer reverse* CAEv2-Rev155 (item 3.2.25). O elemento *cis* AC na orientação senso encontra-se destacado por uma caixa. Sublinhado está o sítio de restrição da endonuclease SmaI, o qual foi interrompido pela inserção de AC.



**Figura 37: Mapa de cobertura do sequenciamento da preparação número 12 de pENTR/D-TOPO-AC-CAE.** Imagem gerada com o programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências nucleotídicas originais de pENTR/D-TOPO (Invitrogen), do AC, do CAE e da seqüência apresentada na figura 36. A seta vermelha superior representa o segmento de pENTR/D-TOPO-AC-CAE coberto pelo sequenciamento realizado e o sentido indica o *primer* utilizado nesse evento. *Primer reverse* CAEv2-Rev155, para esquerda. Os segmentos brancos no interior da seta vermelha superior indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

Finalmente, as análises das seqüências das preparações de pENTR/D-TOPO-RHE-CAE obtidas nos sequenciamentos mostraram que nenhum plasmídeo com o elemento RHE ligado foi resultante. Este fato foi posteriormente justificado por um erro na projeção dos *primers* de RHE, resultando em imperfeição na complementariedade de bases entre os *primers* RHE-*For* e RHE-*Rev*, conforme pode ser observado na Figura 38. O erro de complementariedade impediu que os *primers* se anelassem e, portanto, não houve formação de DNA dupla fita, impedindo a inserção do elemento RHE em pENTR/D-TOPO-CAE. Logo, os procedimentos de clonagem do elemento RHE foram encerrados nesta etapa do trabalho.

RHE-For 5'- ATC GTG ACG TGC ACG TC -3'

RHE-Rev 3'- GAC GTG CAC GTC ACG CT -5'

**Figura 38: Primers forward e reverse projetados para o elemento *cis* RHE.** O primer RHE-Rev foi projetado erroneamente. O erro que comprometeu a complementariedade de bases encontra-se destacado por uma caixa. O ácido citidílico em destaque (C) não é complementar ao ácido timidílico (T), sublinhado em RHE-For.

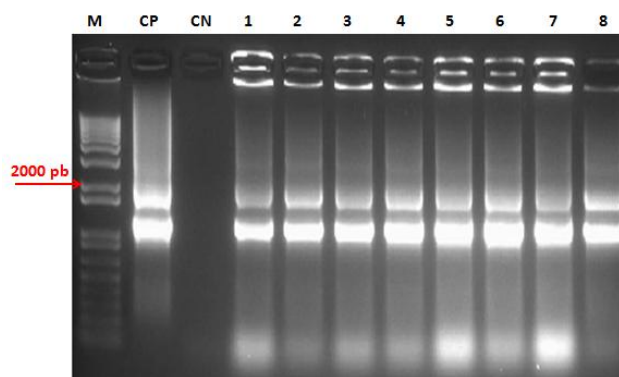
Conforme o padrão de procedimentos adotados, purificações dos plasmídeos pENTR/D-TOPO-W1-CAE, proveniente da colônia número 13, e do plasmídeo pENTR/D-TOPO-AC-CAE, proveniente da colônia número 12 foram realizadas. Os plasmídeos pENTR/D-TOPO-W1-CAE e pENTR/D-TOPO-AC-CAE purificados foram quantificados em 126,4 ng/μL, e 159,2 ng/μL, respectivamente, em preparação para a recombinação com o plasmídeo binário pKGW (KARIMI *et al.*, 2002).

#### 4.5 Adaptação das diferentes versões de CAEs ao vetor binário pKGW

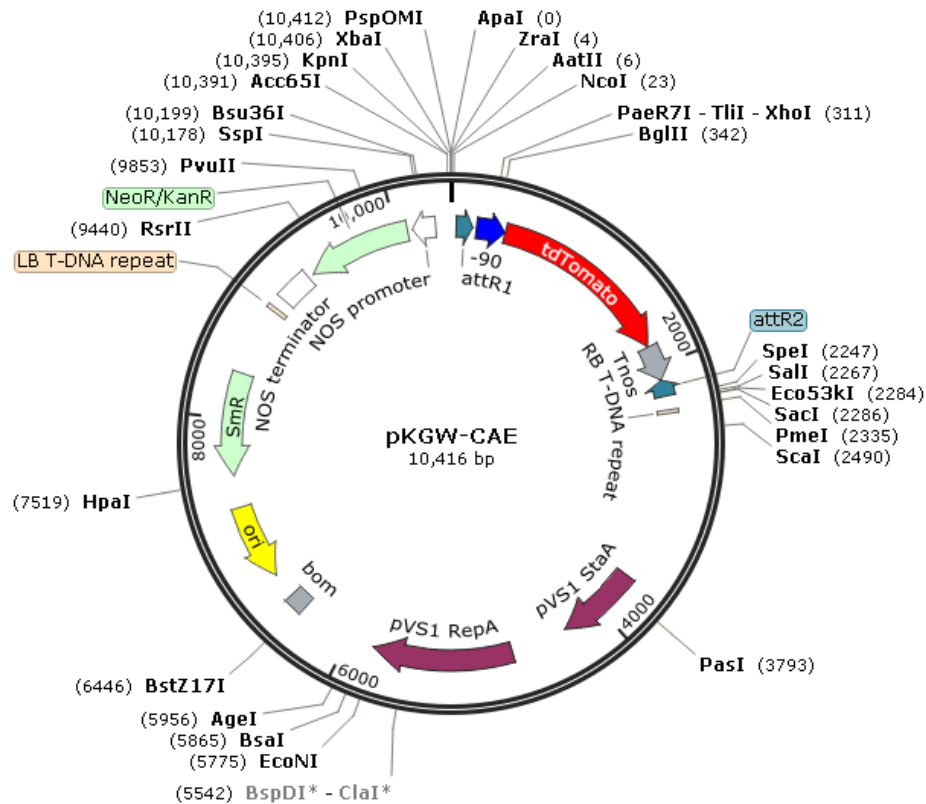
As reações de recombinação dos plasmídeos pENTR/D-TOPO-CAE, pENTR/D-TOPO-35S-CAE, pENTR/D-TOPO-W1-CAE e pENTR/D-TOPO-AC-CAE com o vetor binário pKGW foram realizadas conforme descrito no item 3.3.1 da seção Material & Métodos. Desta forma, foram geradas as versões pKGW-CAE (Figura 40), pKGW-35S-CAE (Figura 46), pKGW-W1-CAE (Figura 42) e pKGW-AC-CAE (Figura 44). Alíquotas dos produtos das reações de recombinação foram utilizados na transformação genética de *A. tumefaciens* LBA4404 por choque térmico (item 3.3.2). Cada evento de transformação resultou em diversas colônias recombinantes de *A. tumefaciens* LBA4404, as quais foram selecionadas com rifampicina a 50 mg/L e espectinomicina a 100 mg/L. Destas, oito colônias provenientes de cada transformação foram inoculadas para a preparação de plasmídeos e confirmação da inserção das construções de interesse em pKGW por PCR.



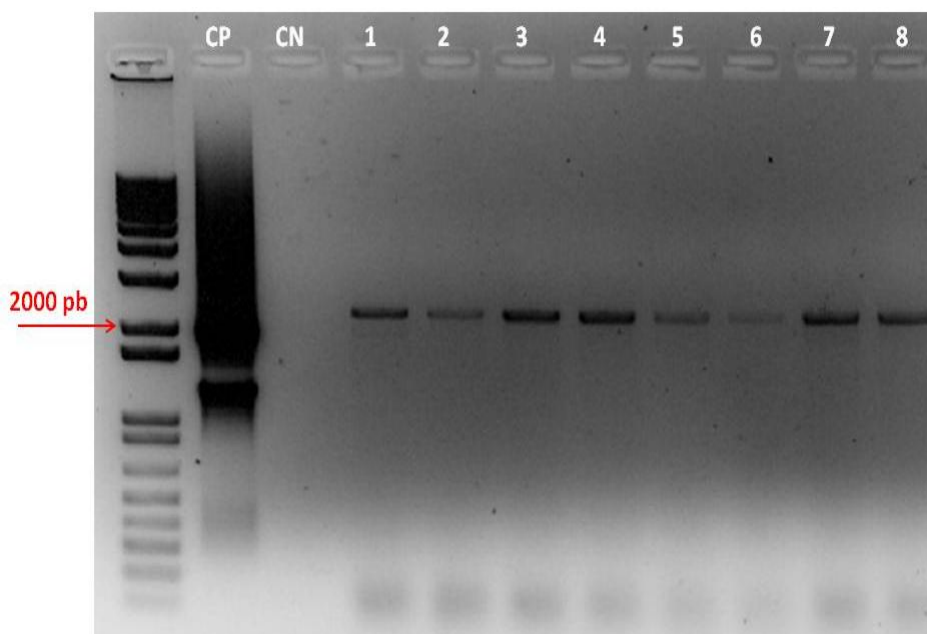
Conforme pode-se observar nas Figuras 39, 41 e 43, todas as versões de plasmídeos pKGW preparados a partir das colônias recombinantes de *A. tumefaciens* LBA4404 resultaram positivamente, com a amplificação de fragmentos conforme tamanhos esperados para os mesmos.



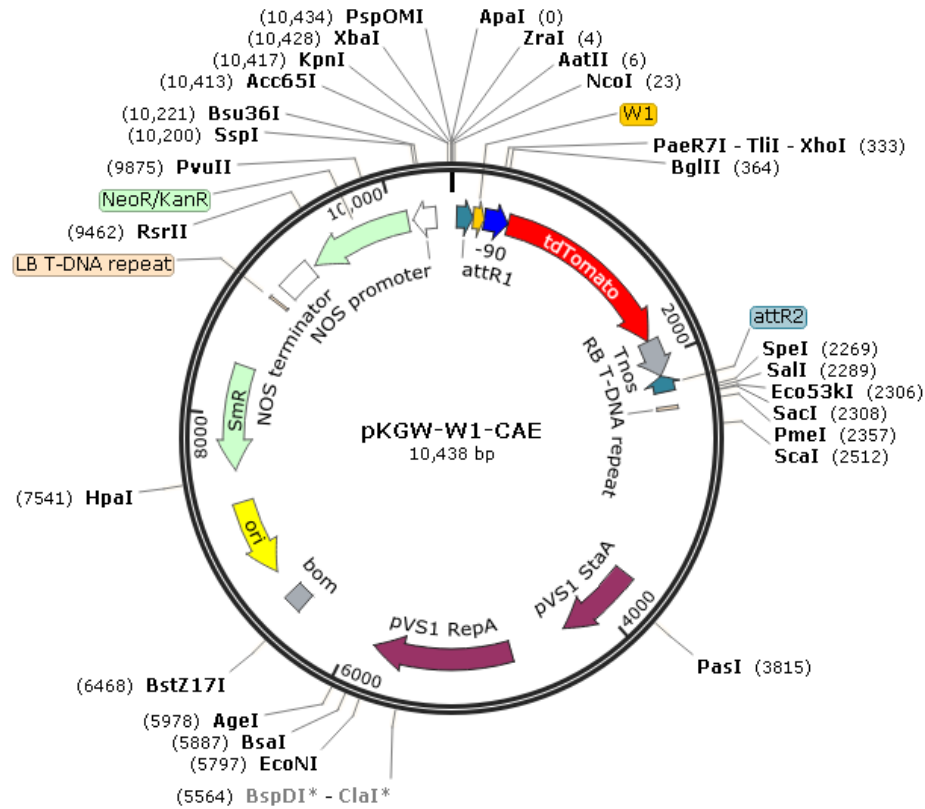
**Figura 39: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de CAE em pKGW.** Primers específicos ao CAE (1.949 pb) foram utilizados na reação. A presença de banda de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como clones positivos todas as preparações analisadas. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com adição de pUC57-CAE como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, resto da mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-8, plasmídeos pKGW-CAE preparados a partir de colônias de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas com o produto da recombinação de pENTR/D-TOPO-CAE com pKGW



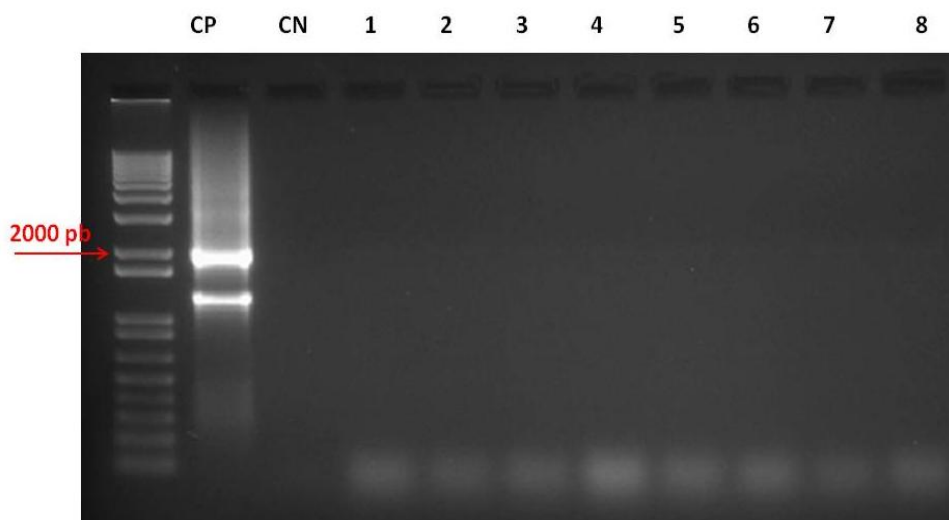
**Figura 40: Mapa do plasmídeo pKGW-CAE.** Imagem gerada com o emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pKGW (KARIMI *et al.*, 2002) e do CAE. *attR2* e *attR1*, sítios de recombinação específica do sistema Gateway; RB e LB T-DNA repeat, sequências repetidas das bordas direita e esquerda do T-DNA do plasmídeo Ti C58; *pVS1 StaA*, gene codificador da proteína estabilizadora do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *pVS1 RepA*, gene codificador da proteína de replicação do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *bom*, base de mobilidade da região derivada de pBR322; *ori*, origem de replicação para alto número de cópias derivada de ColE1/pMB1/pBR322/pUC; *Sm<sup>R</sup>*, gene *aadA*, marcador para espectinomicina e streptomomicina; NOS promoter e terminator, sequências promotora e terminadora do gene codificador da nopalina sintase; *Neo<sup>R</sup>/Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador de seleção para canamicina, neomicina e gentamicina; -90, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *T<sub>nos</sub>*, terminador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.



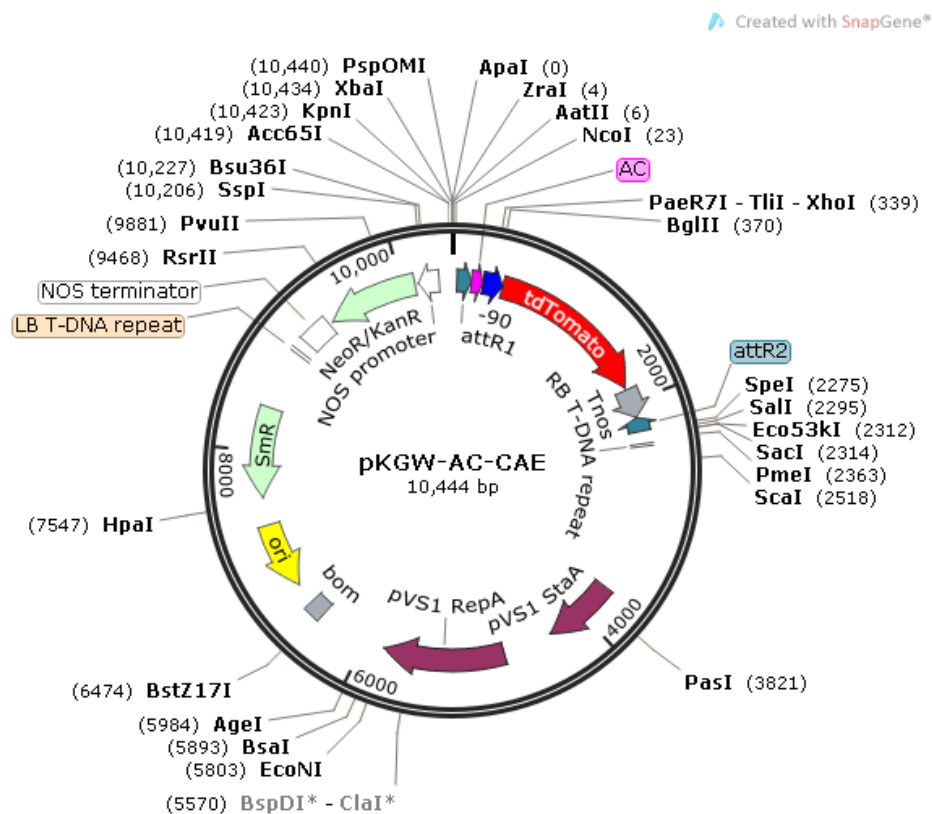
**Figura 41: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de W1-CAE em pKGW.** *Primers* específicos ao W1-CAE (1.970 pb) foram utilizados na reação. A presença de banda de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como clones positivos as todas as preparações analisadas. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com adição da preparação número 13 de pENTR/D-TOPO-W1-CAE como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, resto da mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-8, plasmídeos pKGW-W1-CAE preparados a partir de colônias de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas com o produto da recombinação de pENTR/D-TOPO-W1-CAE com pKGW.



**Figura 42: Mapa do plasmídeo pKGW-W1-CAE.** Imagem gerada com o emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências de nucleotídeos originais de pKGW (KARIMI *et al.*, 2002), do W1, e do CAE. *attR2* e *attR1*, sítios de recombinação específica do sistema Gateway; *RB* e *LB T-DNA repeat*, seqüências repetidas das bordas direita e esquerda do T-DNA do plasmídeo Ti C58; *pVS1 StaA*, gene codificador da proteína estabilizadora do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *pVS1 RepA*, gene codificador da proteína de replicação do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *bom*, base de mobilidade da região derivada de pBR322; *ori*, origem de replicação para alto número de cópias derivada de ColE1/pMB1/pBR322/pUC; *Sm<sup>R</sup>*, gene *aadA*, marcador para espectinomicina e streptomomicina; *NOS promoter* e *terminator*, seqüências promotora e terminadora do gene codificador da nopalina sintase; *Neo<sup>R</sup>/Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador de seleção para canamicina, neomicina e gentamicina; *W1*, elementos cis W1 regulador da expressão de genes vegetais; *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, terminador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.

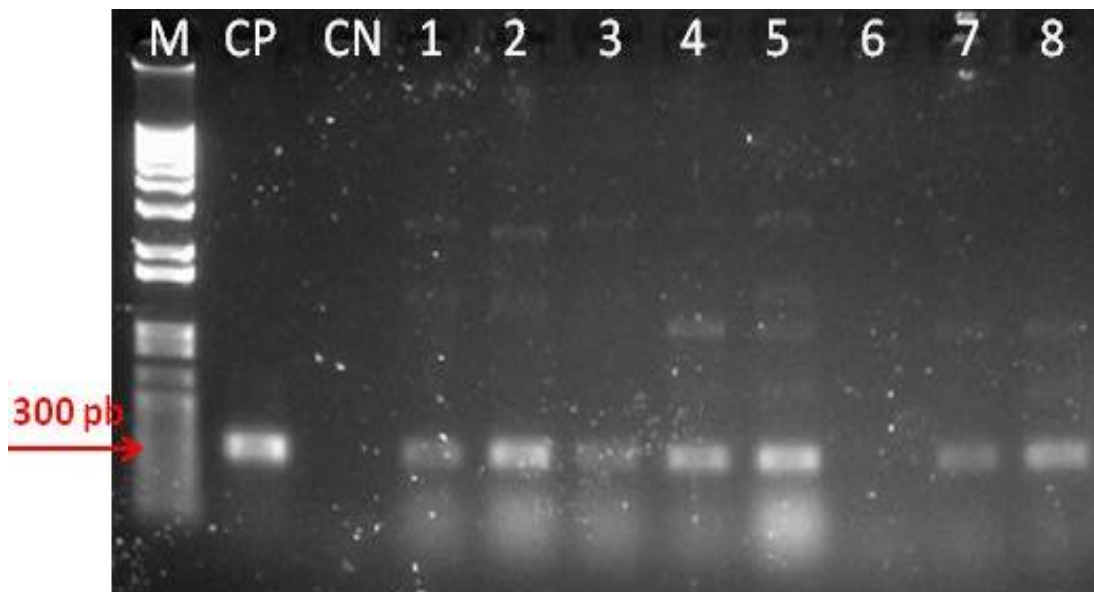


**Figura 43: Imagem de gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de AC-CAE em pKGW.** *Primers* específicos ao AC-CAE (1.977 pb) foram utilizados na reação. A presença de banda de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como clones positivos as todas as preparações analisadas. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com adição da preparação número 12 de pENTR/D-TOPO-AC-CAE como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-8, plasmídeos pKGW-AC-CAE preparados a partir de colônias de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas com o produto da recombinação de pENTR/D-TOPO-W1-CAE com pKGW.

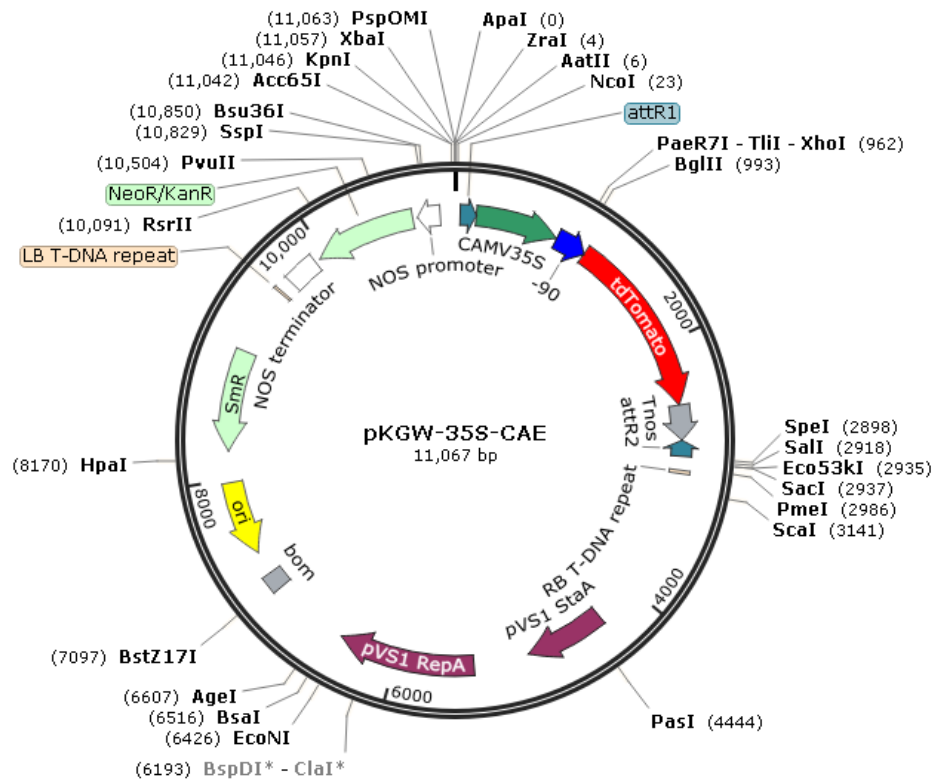


**Figura 44: Mapa do plasmídeo pKGW-AC-CAE.** Imagem gerada com o emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências de nucleotídeos originais de pKGW (KARIMI *et al.*, 2002), do AC, e do CAE. *attR2* e *attR1*, sítios de recombinação específica do sistema Gateway; RB e LB T-DNA repeat, sequências repetidas das bordas direita e esquerda do T-DNA do plasmídeo Ti C58; *pVS1 StaA*, gene codificador da proteína estabilizadora do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *pVS1 RepA*, gene codificador da proteína de replicação do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *bom*, base de mobilidade da região derivada de pBR322; *ori*, origem de replicação para alto número de cópias derivada de ColE1/pMB1/pBR322/pUC; *Sm<sup>R</sup>*, gene *aadA*, marcador para espectinomicina e streptomicina; *NOS promoter* e *terminator*, sequências promotora e terminadora do gene codificador da nopalina sintase; *Neo<sup>R</sup>/Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador de seleção para canamicina, neomicina e gentamicina; AC, elementos cis AC regulador da expressão de genes vegetais; -90, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, terminador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.

Entre os plasmídeos preparados a partir das colônias recombinantes de *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-35S-CAE, apenas o identificado pelo número 6 não resultou em amplificação do fragmento conforme o tamanho esperado (Figura 45).



**Figura 45: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR confirmando a clonagem de 35S-CAE em pKGW.** *Primers* específicos ao CaMV35S simples (300 pb) foram utilizados na reação. A presença de banda de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar clones positivos as todas as preparações analisadas, exceto a número 6. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR com adição de pCAMBIA2300 como DNA-molde; CN, controle negativo, ou seja, mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 1-8, plasmídeos pKGW-35S-CAE preparados a partir de colônias de *A. tumefaciens* LBA4404 transformadas com o produto da recombinação de pENTR/D-TOPO-35S-CAE com pKGW.



**Figura 46: Mapa do plasmídeo pKGW-35S-CAE.** Imagem gerada com o emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências de nucleotídeos originais de pKGW (KARIMI *et al.*, 2002), do CaMV35S originário de pCAMBIA2300 (CAMBIA), e do CAE. *attR2* e *attR1*, sítios de recombinação específica do sistema Gateway; *RB* e *LB T-DNA repeat*, seqüências repetidas das bordas direita e esquerda do T-DNA do plasmídeo Ti C58; *pVS1 StaA*, gene codificador da proteína estabilizadora do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *pVS1 RepA*, gene codificador da proteína de replicação do plasmídeo pVS1 de *Pseudomonas*; *bom*, base de mobilidade da região derivada de pBR322; *ori*, origem de replicação para alto número de cópias derivada de ColE1/pMB1/pBR322/pUC; *Sm<sup>R</sup>*, gene *aadA*, marcador para espectinomicina e streptomina; *NOS promoter* e *terminator*, seqüências promotora e terminadora do gene codificador da nopalina sintase; *Neo<sup>R</sup>/Kan<sup>R</sup>*, gene *nptII*, marcador de seleção para canamicina, neomicina e gentamicina; *CAMV35S*, CaMV35S originário de pCAMBIA2300 (CAMBIA); *-90*, promotor básico do CAE; *tdTomato*, gene repórter *tdTomato-ER*; *Tnos*, terminador da nopalina sintase. Sítios para endonucleases presentes no plasmídeo estão representados por suas respectivas abreviaturas.



#### 4.6 Transformação genética de *A. thaliana* com *A. tumefaciens* LBA4404 armadas com as diferentes versões de pKGW-CAE

Ensaio de transformação de *A. thaliana* Columbia-0 empregando-se células de *A. tumefaciens* LBA4404 armadas alternativamente com pKGW, pKGW-CAE, pKGW-35S-CAE, pKGW-W1-CAE ou pKGW-AC-CAE foram realizadas pelo método de imersão de inflorescências (item 3.4.2). Após o período necessário para o desenvolvimento e a maturação de sementes, estas foram coletadas e submetidas à seleção *in vitro* com canamicina a 100 mg/L. Sementes transgênicas e não transgênicas germinaram normalmente em meio seletivo, porém, conforme o esperado após 10 dias, plântulas não-transformadas estiolaram completamente e pararam seu desenvolvimento, enquanto plântulas transformadas apresentaram-se verdes, com cotilédones abertos e expandidos, e raízes bem desenvolvidas. Exemplo deste tipo de observação está representado na Figura 47.



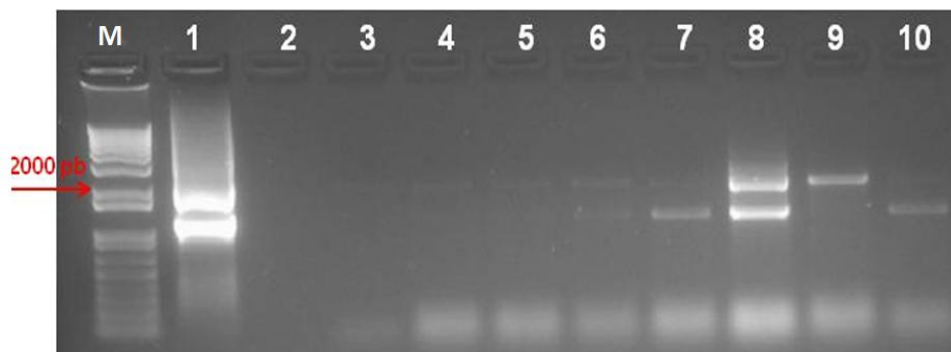
**Figura 47: Seleção de plantas transformadas de *A. thaliana*.** Imagem de plântulas não-transgênicas estioladas e plântula transgênica de *A. thaliana* transformada com *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-CAE. Todas as plantas verdadeiramente transformadas apresentaram-se verdes, com cotilédones expandidos e raízes vigorosas desenvolvidas em meio MS acrescido de canamicina a 100 mg/L.

Foram selecionadas 12 plântulas de *A. thaliana* transformadas com o T-DNA derivado de pKGW, 12 plântulas transformadas com pKGW-CAE, 11 plântulas transformadas com pKGW-35S-CAE e, ainda 6 plântulas transformadas com pKGW-W1-CAE, por apresentarem as características descritas acima, as quais foram transferidas para copos plásticos contendo solo do tipo turfa.

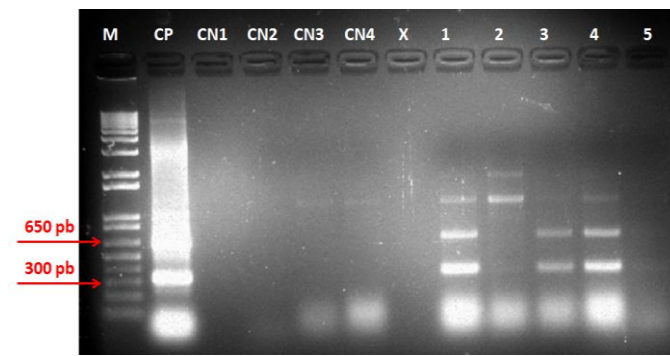
Surpreendentemente, nenhuma das sementes resultante da transformação de *A. thaliana* com *A. tumefaciens* LBA4404::pKGW-AC-CAE vingou transgênica, uma vez que nenhuma plântula germinada apresentou as características comuns das plântulas transformadas com as outras versões. Cabe ressaltar, também, que algumas das plântulas selecionadas *in vitro* neste trabalho não mantiveram crescimento vigoroso quando transferidas para o solo, não permitindo a produção de material vegetal suficiente para verificação de seu estado transgênico. Estas plantas enfraquecidas foram perdidas ao longo do período designado para desenvolvimento, ou seja, cerca de 15 dias. Restaram para coleta de material vegetal e extração de DNA, portanto, 5 plantas transformadas com pKGW, 6 plântulas transformadas com pKGW-CAE e 5 plantas transformadas com pKGW-35S-CAE. Todas as plântulas de *A. thaliana* transformadas com pKGW-W1-CAE previamente selecionadas foram perdidas, o que impediu a continuidade das análises para comprovação do estado transgênico das mesmas.

Na etapa seguinte à seleção *in vitro* e ao pleno desenvolvimento das plantas no solo, amostras de DNA foram extraídas das folhas de plantas transformadas e não transformadas (controles) e PCRs foram realizadas para verificação da integração do CAE e do 35S-CAE nos genomas das plantas conforme descrito nos itens 3.4.5 e 3.4.6 da seção Material & Métodos. Plantas não transformadas e plantas transformadas com o vetor pKGW parental (vazio) foram utilizadas como controles negativos nestes ensaios. Conforme ilustrado na Figura 48, bandas de tamanho condizente com o esperado foram observadas em 5 das 6 amostras de DNA de *A. thaliana* recuperadas da transformação realizada com pKGW-CAE, caracterizando as plantas identificadas pelos números 6, 7, 8, 9, e 10, portanto, como transgênicas. Já a imagem representada na Figura 49 permitiu-nos concluir que,

entre as 5 plantas de *A. thaliana* transformadas com pKGW-35S-CAE, apenas as de números 1, 3 e 4 continham, de fato, T-DNA de pKGW-35S-CAE integrado em seus genomas. Todas as plantas transgênicas para 35S-CAE apresentaram fenótipo normal, desenvolveram-se normalmente e completaram seu ciclo de vida em paralelo às plantas não transformadas ou transformadas com pKGW parental, ou seja, produziram sementes. Por outro lado, dentre as plantas transgênicas geradas a partir da transformação com pKGW-CAE, apenas as de números 6, 8 e 9 apresentaram as mesmas características.



**Figura 48: Imagem de gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de T-DNA de pKGW-CAE em plantas de *A. thaliana*.** Primers específicos ao CAE, capazes de permitir a amplificação de fragmento de 1.949 pb, foram utilizados na reação. A presença de bandas de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como transgênicas as plantas identificadas na imagem pelos números 6, 7, 8, 9 e 10. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); 1, controle positivo, ou seja, mistura de PCR acrescida do plasmídeo pKGW-CAE; 2, controle negativo número 1, ou seja, mistura de PCR sem adição de DNA-molde; 3, controle negativo número 2, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* não transformada; 4, controle negativo 3, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* transformada com pKGW; 5-10, misturas de PCR acrescidas de DNA de *A. thaliana* transformadas com pKGW-CAE.

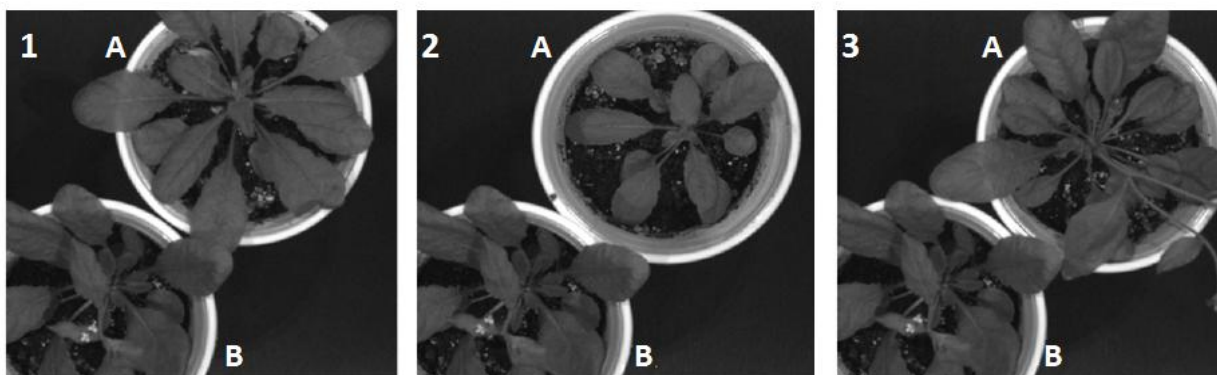


**Figura 49: Imagem do gel resultante da eletroforese dos produtos da PCR com vistas a confirmar a presença de T-DNA de 35S-CAE em plantas de *A. thaliana*.** Primers específicos ao 35S-CAE foram utilizados na reação. A presença de bandas de tamanho coerente com o esperado permitiu identificar como clones positivos plantas identificadas na imagem pelos números 1, 3, e 4. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas); CP, controle positivo, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA do plasmídeo pKGW-35S-CAE; CN1, controle negativo número 1, ou seja, mistura de PCR sem adição de DNA-molde; CN2, controle negativo número 2, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* não transformada; CN3, controle negativo 3, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* transformada com pKGW; CN4, controle negativo 4, ou seja, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* transformada com pKGW diferente da utilizada no CN3; 1-5, mistura de PCR acrescida de DNA de *A. thaliana* transformadas com pKGW-35S-CAE.

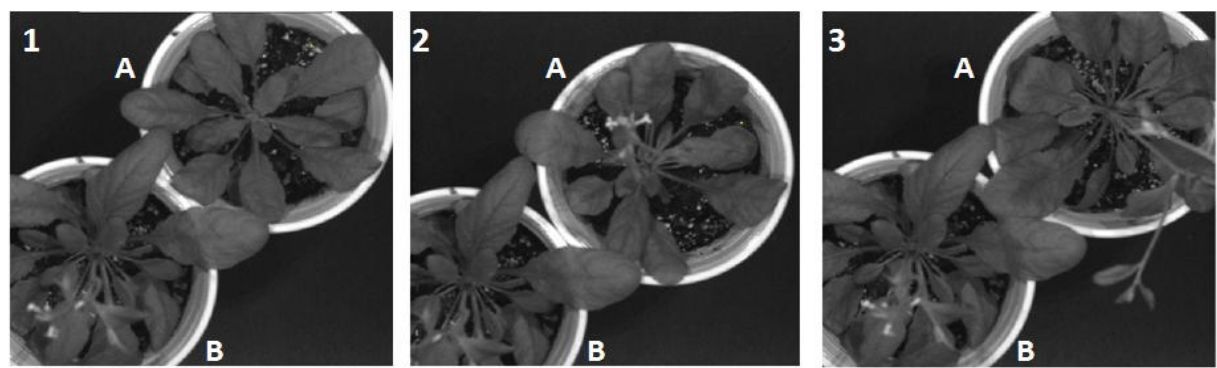
#### 4.7 Ensaios para detecção de fluorescência em *A. thaliana* transgênicas

Após a realização de tentativas preliminares de visualização de fluorescência da proteína repórter tdTomato-ER em plantas comprovadamente transgênicas utilizando lanterna armada com lâmpada de luz verde (554 nm) e óculos de filtro vermelho, as plantas transgênicas obtidas nesse trabalho foram analisadas por meio de imagens de fluorescência no equipamento de detecção de fluorescência *in vivo* e digitalização de imagens IVIS Lumina II (CALIPER, 2008), utilizando-se filtro de excitação de 535 nm pois, entre os filtros disponíveis, este apresentava comprimento de onda mais próximo ao ideal para tdTomato-ER (554 nm). As Figuras 50 e 51 são exemplos de algumas das imagens produzidas com este sistema de detecção. Não foram observados, por quaisquer dos métodos empregados, sinais de fluorescência nas plantas transgênicas obtidas nesse trabalho. Estes resultados negativos foram surpreendentes considerando (i) a identidade e integridade de todas as sequências gênicas empregadas, confirmadas por sequenciamento de DNA; (ii) o franco

desenvolvimento das plantas transgênicas em meio contendo o agente seletivo canamicina a 100 mg/L; e (iii) a detecção por PCR de fragmentos relativos ao CAE e ao 35S-CAE nos genomas vegetais.



**Figura 50: Conjunto A de imagens de fluorescência de plantas transgênicas de *A. thaliana* geradas com o emprego do equipamento IVIS Lumina II (CALIPER, 2008).** Excitação a 535 nm e tempo de exposição de 1 segundo foram empregados na geração das imagens. 1, A, *A. thaliana* transformada com pKGW; B, *A. thaliana* não transformada; 2, A, *A. thaliana* transformada com pKGW-35S-CAE; B, *A. thaliana* não transformada; 3, A= *A. thaliana* transformada com pKGW-CAE; B, *A. thaliana* não transformada.



**Figura 51: Conjunto B de imagens de fluorescência de plantas transgênicas de *A. thaliana* geradas com o emprego do equipamento IVIS Lumina II (CALIPER, 2008).** Excitação a 535 nm e tempo de exposição de 1 segundo foram empregados na geração das imagens. 1, A, *A. thaliana* transformada com pKGW; B, *A. thaliana* não transformada; 2, A, *A. thaliana* transformada com pKGW-35S-CAE; B, *A. thaliana* não transformada; 3, A= *A. thaliana* transformada com pKGW-CAE; B, *A. thaliana* não transformada.

## 5. Discussão

O perfil de expressão de um gene qualquer é determinado, principalmente, por seu promotor, por fatores de transcrição específicos que se associam ao promotor e por outras sequências *cis*-regulatórias presentes no genoma (WRAY *et al.*, 2003). A regulação espaço-temporal da expressão gênica está relacionada com a ligação de fatores de transcrição em sequências localizadas na região proximal ou a certa distância do promotor *core* (WEINZIERL, 1999; CAREY *et al.*, 2009).

A ampla maioria dos cassetes de expressão empregados na produção de vegetais geneticamente modificados é composta por promotores fortes e constitutivos. Estes promotores induzem uma expressão generalizada, isto é, em todas as partes do vegetal e em todos os estádios do desenvolvimento, o que causa gastos energéticos elevados e dificulta a recuperação de um maior número de indivíduos transgênicos. Promotores tecido-específicos, por outro lado, são capazes de direcionar a expressão de transgenes apenas para órgãos/tecidos de interesse, permitindo maior racionalização de produção de proteínas recombinantes. Este fato poderia contribuir para que houvesse maior valorização e aceitação de produtos derivados de vegetais geneticamente modificados.

Três diferentes promotores sintéticos para plantas foram desenvolvidos neste trabalho: um promotor básico e dois promotores contendo elementos *cis* para regulação tecido-específica. Sequências consenso de elementos *cis* canônicos de promotores vegetais foram dipostas em distâncias diferentes das originalmente observadas na região promotora mínima (-90) do CaMV35S (BENFEY *et al.*, 1990) para compor o promotor básico artificial. Este promotor básico artificial foi modificado pela inclusão dos elementos *cis* W1 e AC, dando origem a outros dois promotores. As sequências de W1 e AC foram respectivamente descritas na literatura como *enhancers* semente-específico e xilema-específico (SÉGUIN *et al.*, 1991; PATER *et al.*, 1993; HATTON *et al.*, 1995). Um terceiro elemento *cis* foi tentativamente utilizado, o RHE, capaz de direcionar a transcrição às raízes (WON *et al.*, 2009). Porém, erro na projeção de adaptadores para este elemento *cis* não permitiram a continuidade

das análises. Finalmente, uma versão do CAE contendo o promotor CaMV35S duplicado, derivado do plasmídeo pCAMBIA2300 (CAMBIA), também foi gerado para servir como controle positivo às análises.

As construções plasmidiais e especialmente as estruturas modulares dos promotores desenvolvidos neste trabalho representam atividade inventiva e inédita, sendo diferente de todas as outras encontradas na literatura existente. BHULLAR *et al.* (2013), por exemplo, buscando alternativas para solucionar o problema do silenciamento gênico causado por homologia, desenvolveram uma sequência promotora artificial por meio da introdução dos elementos *cis* presentes no domínio A do promotor CaMV35S em fitas de DNA sintéticas a distâncias equivalentes às observadas no promotor CaMV35S. Os mesmos autores criaram uma série de outros promotores substituindo a região promotora mínima do CaMV35S por promotores mínimos heterólogos de plantas sem, no entanto, alterar os demais domínios do CaMV35S. Em outros trabalhos, como o desenvolvido por RUSHTON *et al.* (2002), promotores artificiais foram projetados com variações de números de cópias de elementos *cis*, posições e espaçamentos dos elementos em relação ao TATA *box* do promotor mínimo do CaMV35S.

As estratégias utilizadas para a projeção de promotores sintéticos propostas neste trabalho diferem em pontos importantes daquelas encontradas na literatura. A versão de TATA *box* empregada para compor o promotor mínimo artificial dos CAEs, a qual foi baseada em alinhamentos realizados por SHAHMURADOV *et al.* (2003) com 171 promotores vegetais, difere de todas as versões de TATA *box* empregadas por BHULLAR *et al.* (2003), incluindo aquela apresentada por estes autores como consenso para plantas. Além disto, a versão de TATA *box* empregada no presente trabalho não foi anteriormente testada em outro promotor sintético que se tenha conhecimento. Alterações de distâncias relativas de CAAT *box*, TATA *box* e o TSS, bem como distância relativa do TSS ao ATG de início de tradução conforme as realizadas neste trabalho também não foram observadas em qualquer outro.

Todas as etapas moleculares propostas para o desenvolvimento do presente tema de mestrado, desde a projeção de promotor artificial até a síntese do mesmo,

das clonagens e subclonagens até a obtenção de vetores plasmidiais binários em *A. tumefaciens* LBA4404 para transformação de plantas, bem como a obtenção e análise de plantas transgênicas de *A. thaliana* foram conduzidas e concluídas. Destacamos que o protocolo de transformação de *E. coli* utilizado neste trabalho resultou de uma série de tentativas para atingir a máxima eficiência de transformação, e é considerado um dos melhores métodos de transformação entre os disponíveis atualmente (YOSHIDA & SATO, 2009).

Embora todas as etapas experimentais moleculares tenham sido executadas e cuidadosamente conferidas por sequenciamento de DNA, apenas dois conjuntos de linhagens de *A. thaliana* transgênicas foram obtidas, sendo elas portadoras do CAE originalmente projetado e da versão 35S-CAE. Como já discutido acima, versão do CAE contendo o elemento *cis* RHE não foi gerada por erro na projeção de *primers*. Plantas transgênicas contendo esta versão RHE-CAE, bem como as versões W1-CAE e AC-CAE não foram obtidas, embora o sucesso tenha sido obtido nas construções gênicas das duas últimas.

Nitidamente, a seleção de plantas transgênicas, realizada com o antibiótico canamicina, foi bem sucedida. Conforme o esperado, o antibiótico inibiu a formação de raízes em plantas não-transgênicas, impedindo o desenvolvimento de plantas após 10 dias da germinação (HORSCH *et al.*, 1985; GALLOIS & MARINHO, 1995). Este fato demonstrou que tanto o gene *nptII* presente em pKGW como o próprio agente de seleção foram efetivos. Contudo, a eficiência dos ensaios de transformação foi baixa, com 5 plantas derivadas da transformação com *A. tumefaciens* LBA4404:pKGW parental, 5 plantas derivadas da transformação com pKGW-CAE e 3 plantas derivadas da transformação com pKGW-35S-CAE. Conforme descrito, nenhuma planta foi obtida como resultado da transformação de *A. thaliana* com pKGW-AC-CAE ou pKGW-W1-CAE. ZHANG *et al.* (2006) relataram que a eficiência do método de transformação “*floral dip*”, geralmente, não é alta. Contudo, o número de sementes produzidas por plantas de *A. thaliana* deveria garantir a recuperação de um número suficiente de eventos transgênicos, mesmo em um único ensaio de transformação. De acordo com MEINKE (1994), uma única



planta de *A. thaliana* pode produzir mais de 20.000 sementes durante seu ciclo de vida. Rotineiramente, uma semente transformada é obtida para cada 100 colhidas de plantas submetidas à transformação por *floral dip* (ZHANG *et al.*, 2006). Considerando estes fatos e ainda que um total de 45 plantas selvagens foram submetidas aos ensaios de transformação, ou seja, 15 plantas para cada versão do CAE, esperava-se obter um número de plantas transgênicas muito maior do que o real.

CLOUGH e BENT (2002) testaram diversas variáveis consideradas importantes para a eficiência de transformação de *A. thaliana* via *floral dip*. Os resultados obtidos por estes autores indicaram que os sais contidos no meio MS, bem como seus hormônios e outros constituintes não fazem diferença para a seleção de sementes transformadas, e que a densidade de agrobactérias contida na solução de sacarose utilizada no procedimento de transformação também não é crucial desde que a quantidade correta de surfactante esteja presente na mesma. Este produto auxilia os gametas femininos da planta na absorção do meio de inoculação que contém as agrobactérias (BECHTOLD *et al.*, 2003). CURTIS e NAM (2001) realizaram estudos comparativos de eficiência com um grupo de surfactantes e demonstraram que, para o método de transformação *floral dip*, melhores resultados são obtidos quando o surfactante Silwet L-77, um trisiloxano, é empregado. Nos ensaios de transformação realizados neste trabalho utilizou-se uma concentração de 0,002% de Silwet L-77 no meio de inoculação, pois esta quantidade foi definida como ideal no protocolo clássico de transformação, o qual alerta que concentrações maiores do que esta podem ser tóxicas para as plantas (ZHANG *et al.* 2006). Já outros autores definiram que uma concentração mínima de 0,003% de Silwet L-77 no meio de inoculação seria necessária para obter-se sucesso (LOGEMANN *et al.*, 2006). Em uma análise das possíveis causas da baixa eficiência de transformação de plantas verificada neste trabalho, sugere-se, portanto, que este fato possa estar relacionado com a qualidade e a quantidade de reagentes utilizados nos ensaios, sobretudo, de surfactante. Esta questão poderá ser respondida no futuro por meio da

realização de experimentos de transformação utilizando-se diferentes quantidades de surfactante e/ou substituindo-se reagentes.

Para DESFEUX *et al.* (2002), o fator que mais influencia na eficiência de transformação por *floral dip* é a sanidade das plantas. A aparência foliar, ou seja, seu estado e coloração, é um indicador de sanidade vegetal (ALTIERI & NICHOLLS, 2002). Cabe ressaltar que, após os ensaios de *floral dip*, observou-se uma quantidade considerável de folhas necrosadas nas plantas submetidas ao protocolo, o que pode ter prejudicado o processo de fotossíntese e, por consequência, o desenvolvimento de novas sementes. Linhagens de plantas transformadas com os CAEs modificados pela inclusão dos *enhancers* tecido-específicos W1 e AC não foram recuperadas. Diferentemente dos demais ensaios de transformação, os ensaios realizados com o objetivo de obter estas linhagens foram realizados em duplicidade com as mesmas plantas pois ZHANG *et al.* (2006) recomendam esta prática para se obter um número maior de plantas transformadas. Neste trabalho, a “dupla transformação” surtiu resultados negativos. Possivelmente, a repetição da exposição ao surfactante tenha sido maléfica para as plantas. Novas tentativas de transformação de *A. thaliana* com os CAEs modificados pela inclusão dos *enhancers* não foram realizadas dentro do período de mestrado uma vez que não se dispunha de tempo suficiente para tal. A projeção dos CAEs e as atividades de clonagem, transformação e purificação de plasmídeos demandaram um grande período de tempo e impediram a execução de maior número de experimentos previstos para realização de análises nas plantas.

Uma grande quantidade de plântulas em fase de seleção *in vitro* e no solo foi perdida neste trabalho devido às contaminações fúngicas. A seleção de plântulas transgênicas de *A. thaliana* é um processo demorado e delicado. Cerca de 7 a 10 dias são necessários para selecionar plantas resistentes à canamicina. Durante este período prolongado de tempo, a contaminação fúngica pode impossibilitar a recuperação de transformantes. Estoques de sementes geradas a partir de plantas submetidas ao *floral dip* podem estar contaminados com fungos, pois utiliza-se sacarose em alta concentração no meio de inoculação e, além disto, as plantas são

inicialmente mantidas em ambiente quente e úmido, o que é ideal para o desenvolvimento destes contaminantes. Além de prejudicar severamente o desenvolvimento das plantas, podendo inclusive ocasionar a morte das mesmas, fungos contaminantes podem, durante a seleção de plântulas, ocasionar o esgotamento do antibiótico presente no meio seletivo o que permite que não-transformantes permaneçam verdes (HARRISON *et al.*, 2006).

Um método de seleção rápido que poderia ajudar a diminuir as perdas causadas pela infecção de patógenos foi descrito por HARRISON *et al.* (2006) para identificar transformantes de *A. thaliana* Col-0 resistentes à canamicina. De acordo com os autores, após um período de estratificação de dois dias à 4°C no escuro, as sementes deveriam ser iluminadas por 4 a 6 h para que a germinação fosse estimulada e, então continuar no escuro por mais dois dias. Um período subsequente de 24 h de luz foi determinado como suficiente para que transformantes resistentes à canamicina acumulassem clorofila e se diferenciassem de não transformantes que permanecem pálidos, com cotilédones fechados ou não expandidos. Este protocolo de HARRISON *et al.* (2006) poderá ser testado em futuros ensaios de seleção no laboratório. Será necessário, primeiramente corrigir tecnicamente a baixa eficiência da transformação e a seleção de transformantes para prosseguir com o trabalho.

A maioria dos promotores artificiais têm sido desenvolvida e avaliada com a implementação de genes repórteres como GFP, luciferase (LUC) e  $\beta$ -glicuronidase (GUS; VENTER & BOTHA, 2010). O gene *tdTomato-ER*, capaz de emitir fluorescência laranja, foi escolhido como gene repórter para os CAEs desenvolvidos neste trabalho pois foi considerado por MANN *et al.* (2012) como o repórter mais adequado para tecidos vegetais. A ideia inicial era avaliar a atividade dos promotores artificiais pela observação e medida de fluorescência desta proteína em diversos tecidos e órgãos de plantas transgênicas de *A. thaliana*. No entanto, apesar dos resultados de PCR confirmarem a integração dos CAEs em boa parte das plantas que foram recuperadas neste trabalho, sinais de fluorescência laranja ou vermelha não foram detectados em quaisquer das plantas transformadas. A ausência de fluorescência pode ser consequência de uma possível integração parcial T-DNA dos

plasmídeos no genoma das plantas analisadas, do local de inserção dos cassetes no genoma ou, ainda, pode estar relacionada com a efetividade do gene repórter ou dos próprios promotores. Estas hipóteses deverão ser investigadas.

Além dos ensaios de transformação de *A. thaliana* descritos no presente trabalho, foram realizados ainda experimentos de agroinfiltração em *Nicotiana benthamiana* com *A. tumefaciens* GV3101 armado com todas as versões dos CAEs que foram obtidas (resultados não apresentados). Sinais de fluorescência em plantas de tabaco também não foram observados. Cabe destacar que a clorofila das plantas fluoresce naturalmente na região vermelha do espectro e isto poderia prejudicar a observação da fluorescência laranja emitida pela proteína repórter tdTomato-ER. Apesar disso, esta foi a principal razão que levaram MANN *et al.* (2012) a definir o melhor gene e proteína repórteres para plantas, elegendo tdTomato-ER como mais adequada. A comprovação da estabilidade e da viabilidade de tdTomato-ER será fundamental para sanar dúvidas remanescentes deste trabalho. Ensaio de RT-qPCR ou *northern blot*, por exemplo, poderiam ser realizados com *primers* específicos ou sondas de diferentes tamanhos para verificar se o mRNA de *tdTomato-ER* está sendo produzido em tamanho e quantidade correspondentes ao esperado.

Como descrito acima, a versão do CAE que contém o promotor CaMV35S duplicado, originário do plasmídeo pCAMBIA2300, foi construída para ser utilizada como controle positivo neste projeto. Pretendia-se comparar a intensidade da fluorescência emitida pelo gene repórter regulado pelo promotor CaMV35S duplicado, bem como os locais onde esta se manifestava, com a intensidade e locais do mesmo quando regulado pela demais versões do CAE que foram desenvolvidas. Há, na literatura recente, diversos relatos da superexpressão de diferentes transgenes sob regulação do promotor CaMV35S duplicado contido no vetor pCAMBIA2300 (RHEN *et al.*, 2011; CAI *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). O fato de ter sido empregado o promotor CaMV35S duplicado em *tandem* com a região promotora mínima artificial desenvolvida neste trabalho não permitiu que se realizassem as comparações pretendidas pois não foram observados

sinais de fluorescência nem mesmo nas plantas transformadas com essa versão de promotor artificial. Provavelmente, o uso dos promotores *in tandem* tenha interferido negativamente no controle da transcrição do gene repórter. Para resolver esta questão, sugere-se a criação de um novo cassete de expressão mantendo-se o promotor CAMV35S duplicado, o gene repórter e terminador originalmente escolhidos, mas excluindo-se o promotor mínimo -90 artificial da construção.

Uma vez que não foi evidenciada expressão de tdTomato-ER nas plantas transformadas com a versão do CAE que contém o promotor mínimo artificial desenvolvido neste trabalho, não é possível afirmar que o mesmo é funcional. Ainda seria possível realizar experimentos de PCR em tempo real para verificar se a região promotora mínima do CAE possui atividade transcricional, o que a caracterizaria, portanto, como funcionalmente ativa. A não funcionalidade, que foi observada até então, pode estar relacionada, entre outros fatores, ao tamanho que o promotor mínimo apresenta (181 pb), ou à ausência de elementos regulatórios necessários para a correta regulação da expressão do gene repórter e eficiência promotora, tais como *enhancers* e outros elementos distais, ou à efetividade da versão de TATA *box* empregada ou, ainda, às divergências ocasionadas pelo espaçamento e composição das novas sequências flanqueadoras de elementos canônicos que foram criadas neste trabalho.

Os *enhancers* são elementos de DNA que atuam na regulação da transcrição de grande parte dos genes eucarióticos. A ausência de *enhancers* pode, por exemplo, determinar um padrão de expressão gênica inespecífica ou não esperada. Independentemente da sua orientação e posição em relação ao sítio de início da transcrição, um *enhancer* pode exercer suas funções em locais próximos ou a longas distâncias do gene a ser regulado (SINGER *et al.*, 2011). Estes elementos, mesmo quando localizados a mais de 10 kb de distância do gene-alvo, podem aumentar a probabilidade do mesmo vir a ser transcrito, pois auxiliam no processo de desenovelamento da cromatina e o acesso da maquinaria de transcrição à mesma (WALTERS *et al.*, 1995; WEST & FRASER, 2005; RAAB *et al.*, 2010). Portanto, para que um gene venha a ser transcrito com eficiência, é necessário que este possua

vários elementos do tipo *enhancer*, sendo que cada um contribui de maneira cumulativa para a regulação de sua expressão (BLACKWOOD & KADONAGA, 1998).

BHULLAR *et al.* (2003) levantaram a hipótese de que um elemento TATA *box* consenso de plantas pudesse tornar o promotor CaMV35S mais forte. Em um dos promotores artificiais desenvolvidos por estes autores, o elemento TATA *box* original do promotor CaMV35S (TATATAA) foi substituído pelo TATA *box* definido por JOSHI (1987) como consenso para plantas (TATATATA), e todas as demais características do promotor CaMV35S mantiveram-se inalteradas. Cabe ressaltar que a versão de TATA *box* consenso para plantas empregada por esses autores na construção do referido promotor é diferente daquela que foi empregada no presente trabalho (TATAAATA). Os resultados obtidos por BHULLAR *et al.* (2003) sugerem que o elemento TATA viral funciona melhor e é mais eficiente do que o TATA consenso de plantas no contexto do promotor CaMV35S. A versão de TATA *box* consenso para plantas utilizada no presente trabalho também não se mostrou eficiente nos diferentes contextos onde foi aplicada.

Em um levantamento realizado por BHULLAR *et al.* (2003) com diversos promotores virais, foi observado que estes promotores apresentam elementos TATA semelhantes ou idênticos aos do CaMV35S, mas diferentes dos promotores de plantas. Por outro lado, em uma análise com 79 promotores de genes de plantas, não foi verificado qualquer TATA *box* semelhante ao TATA *box* viral. Este fato traz uma questão interessante quanto à eficiência de TATA *box* virais *versus* TATA *box* de plantas. É possível que promotores de plantas tenham suas eficiências melhoradas se tiverem seus elementos TATA substituídos por TATA *box* virais (BHULLAR *et al.*, 2003).

As modificações de distância e composição de sequências flanqueadoras de elementos *cis* canônicos executadas na projeção do promotor mínimo dos CAEs também podem, de alguma maneira, ter interferido negativamente na eficiência deste. Existem regiões dentro de uma sequência promotora onde a homologia não pode ser quebrada. O rearranjo de elementos pode não ser propício para as

interações proteína-proteína dos fatores de transcrição (BHULLAR *et al.*, 2003). Esta também é uma explicação possível para a não funcionalidade dos CAEs que deverá, portanto, ser melhor estudada. Ensaios realizados por RUSHTON *et al.* (2002) demonstraram *in vivo* como variações de ordem de elementos *cis* e de espaçamento entre os elementos em relação ao TATA *box* do promotor mínimo do CaMV35S podem influenciar dramaticamente a força promotora e induzibilidade do mesmo. A melhor alternativa para criar um promotor artificial talvez seja manter a organização entre elementos *cis* similar à de promotores já existentes (BHULLAR *et al.*, 2003).

Há na literatura diversos relatos de multimerização de elementos *cis* que resultaram em aumento progressivo de força promotora. Um trabalho realizado por CAZZONELLI e VELTEN (2008), por exemplo, demonstrou que a multimerização de elementos *cis* fracos no promotor frequentemente produz um efeito aditivo linear, conferindo atividade crescente do gene repórter na proporção direta ao número de cópias de elementos *cis* fracos. A completa ocupação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição contribui substancialmente para a estabilidade do complexo PIC no TATA *box*. Este fato sugere que a ligação hierárquica dos fatores de transcrição em múltiplos motivos *cis* situados em um módulo sintético é um evento harmônico necessário para o bom funcionamento do promotor sintético (SAWANT *et al.*, 2005). Por outro lado, o emprego repetitivo do mesmo elemento em um promotor pode, também, impedir a transcrição de genes endógenos uma vez que tais promotores podem demandar uma quantidade muito grande de fatores de transcrição (BHULLAR *et al.*, 2003). O excesso de motivos *cis* sintéticos pode esgotar fatores de transcrição endógenos necessários para a manutenção de funções *housekeeping* (SAWANT *et al.*, 2005). O conhecimento destes fatos será importante para futuras projeções de novas versões do CAE, as quais poderão ser desenvolvidas com elementos *cis* multimerizados. A estrutura modular do CAE permite que elementos *cis* sejam ligados em diferentes posições e em diferente número de cópias.

## 6. Conclusão e perspectivas

No presente trabalho foram desenvolvidas quatro versões de CAEs contendo diferentes promotores gênicos vegetais sintéticos, o gene repórter *tdTomato-ER* e o terminador da nopalina sintase. Linhagens transgênicas de *A. thaliana* portadoras de duas dessas versões foram recuperadas, incluindo aquela que foi projetada para ser empregada como controle positivo. Embora as plantas sejam nitidamente resistentes ao antibiótico seletivo e apresentem as construções transgênicas detectáveis por PCR em seus genomas, sinais de fluorescência laranja não foram detectados em quaisquer das plantas transgênicas obtidas, impossibilitando, até então, a caracterização da funcionalidade dos promotores. Neste caso, experimentos de RT-PCR poderão ainda ser executados para verificar se há acúmulo de transcritos de *tdTomato-ER* nas plantas transgênicas obtidas, o que caracterizaria os promotores como funcionalmente ativos.

Novas tentativas de transformação de *A. thaliana* com os CAEs modificados pela inclusão dos *enhancers* W1 e AC poderão ser realizadas utilizando-se novos reagentes e quantidades de surfactante conforme descrito na discussão acima. Adicionalmente, o protocolo de seleção de plântulas transgênicas descrito por HARRISON *et al.* (2006) poderá ser empregado para amenizar as perdas ocasionadas por contaminação fúngica. Quando linhagens de *A. thaliana* forem obtidas com W1- e AC-CAE, será possível avaliar a atividade dos promotores em diferentes órgãos e tecidos senão pela detecção e medida de fluorescência da proteína repórter, por experimentos de RT-PCR.

Ensaio bioquímico e de hibridização poderão contribuir para o esclarecimento das questões remanescentes deste trabalho. Por meio deste tipo de experimento será possível definir se o mRNA de *tdTomato-ER* está sendo transcrito em tamanho coerente com o esperado, se está sendo corretamente traduzido em



proteína e até mesmo se a ausência de fluorescência notada está relacionada com silenciamento decorrente do local de inserção dos cassetes no genoma das plantas.

Projeções de novas versões do CAE contendo novos *enhancers* e *enhancers* multimerizados ainda poderão ser realizadas. Os *enhancers* também poderão ser ligados em diferentes posições do CAE. Estas variações de número e espaçamento de elementos *cis* podem surtir efeitos positivos, conferindo maior força e induzibilidade aos promotores.

## 7. Referências bibliográficas

ABEEL, T.; SAEYS, Y. & BONNET, E. Generic eukaryotic core promoter prediction using structural features of DNA. *Genome Research*. 18: 310-323, 2008.

ABREU, H.; MAÊDA, J.; LATORRACA, J.; PEREIRA, R.; MONTEIRO, M.B.; ABREU, F. & CARMO, J. Proposta de modificação da biossíntese da lignina como estratégia para correção de defeitos em madeiras. *Silva Lusitana*. 11: 217-225, 2003.

AHUJA, M. R. Fate of transgenes in the forest tree genome. *Tree Genetics & Genomes*. 7: 221-230, 2011.

ALTIERI, M.A. & NICHOLLS, C.I. Um método agroecológico rápido para la evaluación de la sostenibilidad de cafetales. *Manejo integrado de plagas y agroecología*. Costa Rica. 64:17-24. 2002.

AN, G.; COSTA, M.A. & HA, S.B. Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible. *Plant Cell*. 2: 225-233, 1990.

BECHTOLD, N.; JOLIVET, S.; VOISIN, R. & PELLETIER, G. The endosperm and the embryo of *Arabidopsis thaliana* are independently transformed through infiltration by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 12: 509–517, 2003.

BENFEY, P.N. & CHUA, N.H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*. 250:959–966, 1990.

BENFEY, P.N.; REN, L. & CHUA, N.H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *The Embo Journal*. 9: 1677–1684, 1990.

BHULLAR, S.; CHAKRAVARTHY, S.; ADVANI, S.; DATTA, S.; PENTAL, D. & BURMA, P.K. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping. *Plant Physiology*. 132:988–998, 2003.

BHULLAR, S.; DATTA, S. & BURMA, P.K. Delayed trans-inactivation of synthetic domain A 35S promoters by “Tobacco 271 Locus” due to reduced sequence homology. *Plant Molecular Biology Reporter*. 29:1–11, 2010.

BHULLAR, S.; DATTA, S.; ADVANI, S.; CHAKRAVARTHY, S.; GAUTAM, T.; PENTAL, D. & BURMA, P.K. Functional analysis of the cauliflower mosaic virus 35S promoter: re-evaluation of the role of subdomains B5, B4, and B2 in promoter activity. *Plant Biotechnology Journal*. 5:696–708, 2007.

BIMBOIM, H. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7: 1513-1523, 1979.

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

BLAZECK, J. & ALPER, H.S. Promoter engineering: Recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnology Journal*. 8: 46-59, 2013.

BRASILEIRO, A.C.M. & CARNEIRO, V.T.D.C. Manual de transformação genética de plantas. 1 a Edição. Brasília-SPI/ Embrapa-Cenargen, 1998.

BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; KEITH, R & WALTER, P. *Molecular biology of the cell*, 6th Edition, Garland Science Publishers, 1.464 p., 2014.

BUTAYE, K. M. J.; CAMMUE, B. P. A.; DELAURE', S. L. & DE BOLLE, M. F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Molecular Breeding*.16: 79–91, 2005.

BUTLER, J.E.F. & KADONAGA, J. T. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes & Development*.15: 2515-2519, 2001.

CAI, Y.F.; YUE, X.F.; LIU, Y.; SUN, Q.; HE, X. & JIANG, H. Molecular cloning, structural analysis and expression of a zinc binding protein in cotton. *African Journal of Biotechnology*. 27: 6991-6999, 2012.

CALIPER. (2008). Disponível em:  
<http://www.thermofisher.com.au/Uploads/file/Scientific/Life-Science-ResearchTechnologies/In-Vivo-Imaging/In-vivo-Imaging-Systems/IVIS-Luminall.pdf>

CAREY, M.; CRAIG, L. & SMALE, S.T. *Transcriptional regulation in eukaryotes: concepts, strategies, and techniques*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2009.

CARPENTER, J. E. Peer-reviewed surveys indicate positive impact of commercialized GM crops. *Nature Biotechnology*. 4:319-321, 2010.

CAZZONELLI, C.I. & VELTEN, J. In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters. *Transgenic Research*. 17: 437–457, 2008.

CHO, H.T. & COSGROVE, D.J. Regulation of root hair initiation and expansion gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*.14: 3237–3253, 2002.

CHRISTENSEN, A.H.; SHARROCK, R.A. & QUAIL, P.H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter

activity following transfer protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 18: 675-689, 1992.

CLOUGH, S.J. & BENT, A.F. (2002) Simplified *Arabidopsis* transformation protocol. Disponível em: <ftp://ftp.Arabidopsis.org/home/tair/Protocols/Simplified-Arabidopsis-transformation-Protocol.pdf>.

COMINELLI, E.; CONTI, L.; TONELLI, C. & GALBIATI, M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*, 30: 355-361, 2013.

CURTIS, I.S. & NAM, H.G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral dip method - plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research*. 10: 363-371, 2001.

DE HOFF, P. L.; BRILL, L. M. & HIRSCH, A. M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular genetics and genomics*. 282: 1-15, 2009.

DESAI, P.N.; SHRIVASTAVA, N. & PADH, H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*. 4:427-435, 2010.

DESFEUX, C.; CLOUGH, S.J. & BENT, A.F. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology*. 123: 895-904, 2000.

DIETRICH, C. & MAISS, E. Red fluorescent protein DsRed from *Discosoma* sp. as a reporter protein in higher plants. *Biotechniques*. 32: 288–290, 2002.

DOYLE, J. & DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19: 11- 15, 1987.

EGELKROUT, E.; RAJAN, V. & HOWARD, J. A. Overproduction of recombinant proteins in plants. *Plant Science*. 184: 83-101, 2012.

EIKE, M. C., MERCY, I. S. & AALEN, R. B. Transgene silencing may be mediated by aberrant sense promoter sequence transcripts generated from cryptic promoters. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 62: 3080-3091, 2005.

FAGARD, M. & VAUCHERET, H. (Trans) gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 167-194, 2000.

FANG, R.X.; NAGY, F.; SUBRAMANIAM, S. & CHUA, N.H. Multiple *cis* regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell*. 1: 141–150, 1989.

GALLOIS, P. & MARINHO, P. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens* – Expression of heterologous genes in tobacco. In: JONES, H. (Ed.). Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Totowa, NJ, v.49. Cap.3, 1995.

GALWAY, M.E.; MASUCCI, J.D.; LOYD, A.M.; WALBOT, V.; DAVIS, R.W. & SCHIEFELBEIN, J.W. The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology*. 166: 740–754, 1994.

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

HARRISON, S.J.; MOTT, E.K.; PARSLEY, K.; ASPINALL, S.; GRAY, J.C. & COTTAGE, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods*. 2:19-26, 2006.

HATTON, D.; SABLONSKI, R.; YUNG, M.H.; SMITH, C.; SCHUCH, W. & BEVAN, M. Two classes of *cis* sequences contribute to tissue-specific expression of a PAL2 promoter in transgenic tobacco. *The Plant Journal*. 7:859-876, 1995.

HEINTZMAN, N.D. & REN, B. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cell Molecular Life Science*. 64: 386-400, 2007.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227: 1291-1231, 1985.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY, 2014.

JONES, D. & SCHOFIELD, J.P. A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*. 18: 7463, 1990.

JONES, H.D. & SPARKS, C.A. Promoter sequences for defining transgene expression. *Methods in Molecular Biology*. 478: 171-84, 2009.

JOSHI, C.P. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Research*. 15: 6643-6653, 1987.

JUVEN-GERSHON, T.; HSU, J. Y.; THEISEN, J. W. & KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*. 20: 253-259, 2008.

KARIMI, M.; INZÉ, D. & DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7: 193-195, 2002.

KOSURI, S. & CHURCH, G.M. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nature Methods*. 11: 499–507, 2014.

KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. 234: 187–208, 1999.

LAM, E. Analysis of tissue-specific elements in the CAMV 35S promoter. In: *Plant promoters and transcription factors, results and problems in cell differentiation*. Berlin, Springer-Verlag, Cap. 8, p. 181-196, 1994.

LATCHMAN, D. & LATCHMAN, D. S. *Eukaryotic transcription factors*. Academic Press, 2010.

LEWIN, B.; KREBS, J.E.; GOLDSTEIN, E.S. & KILPATRICK, S.T. *Lewin's Genes XI*. Jones & Barlet Publisher, 2014.

LIOI, L.; GALASSO, I.; SANTANTONIO, M.; LANAVE, C.; BOLLINI, R. & SPARVOLI, F. Lectin gene sequences and species relationships among cultivated legumes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 1615-1623, 2006.

LOGEMANN, E.; BIRKENBIHL, R.P.; ÜLKER B. & SOMSSICH, I.E. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods*. 2:16- 21, 2006.

LU, X.; JIANG, W.; ZHANG, L.; ZHANG, F.; SHEN, Q.; WANG, G. & TANG, K. AaERF1 Positively Regulates the Resistance to *Botrytis cinerea* in *Artemisia annua*. *PloS One*. 8: 7657-57657, 2013.

LU, X.; ZHANG, F.; SHEN, Q.; JIANG, W.; PAN, Q.; LV, Z.; YAN, T.; FU, X.; WANG, Y.; QIAN, H. & TANG, K. Overexpression of allene oxide cyclase improves the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* L. *PloS One*. 9: 91741, 2014.

LV, X.; SONG, X.; RAO, G.; PAN, X.; GUAN, L.; JIANG, X. & LU, H. Construction vascular-specific expression bi-directional promoters in plants. *Journal of Biotechnology*. 141:104-108, 2009.

MANN, D.G.J.; ABERCROMBIE, L.L.; RUDIS, M.R.; MILLWOOD, R.J.; DUNLAP, J.R. & STEWART, C.N. Very bright orange fluorescent plants: endoplasmic reticulum targeting of orange fluorescent proteins as visual reporters in transgenic plants. *BMC Biotechnology*. 12:17, 2012.

MATZKE, M.A. & MATZKE, A.J.M. How and why do plants Inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiology*. 107: 679-685, 1995.

MEHROTRA, R.; GUPTA, G.; SETHI, R.; BHALOTHIA, P.; KUMAR, N. & MEHROTRA, S. Designer promoter: an artwork of *cis* engineering. *Plant Molecular Biology*. 75:527–536, 2011.

MEINKE, D.W. Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In: *Arabidopsis*, Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R., eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 253-295, 1994.

MERIC, B.; KERMAN, K.; MARRAZZA, G.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. & OZSOZ, M. Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs. *Food Control*. 15: 621–626, 2004.

MOORE, I.; SAMALOVA, M. & KURUP, S. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal*. 45: 651-683, 2006.

MÜLLER, A.E. & WASSENEGGER, M. Control and silencing of transgene expression. In: Christou P. & Klee, H. *Handbook of Plant Biotechnology*, vol. 1. Wiley, Hoboken, N.J., pp. 291-330, 2004.

MURASHINGE, T. & SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 437-498, 1963.

NECHAEV, S. & ADELMAN, K. Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 1809: 34-45, 2011.

ODELL, J.T.; NAGY, F. & CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 313: 810-812, 1985.

PATER, S.; PHAM, K.; CHUA, N.H.; MEMELINK, J. & KIJNEAIB, J. 1993. A 22-bp Fragment of the Pea Lectin Promoter containing essential TGAC-like motifs confers seed-specific gene expression. *The Plant Cell*. 5: 877- 886, 1993.

QUE, Q.; CHILTON, M.D.M.; FONTES, C.M.; HE, C.; NUCCIO, M.; ZHU, T.; WU, Y.; CHEN, J.S. & SHI, L. Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. *GM Crops*. 4: 220-229, 2010.

RAAB, J.R. & KAMAKAKA, R.T. Insulators and promoters: closer than we think. *Nature Reviews Genetics*.11: 439-446, 2010.

RAO, A. Q.; BAKHSH, A.; KIANI, S.; SHAHZAD, K.; SHAHID, A. A.; HUSNAIN, T. & RIAZUDDIN, S. The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*. 27: 753-763, 2009.

RHEN, W.; ZHAO, L.; WANG, Y.; CUI, L., TANH, Y., SUN, X. & TANG, K. Overexpression of homogentisate phytyltransferase in lettuce results in increased content of vitamin E. *African Journal of Biotechnology*. 10: 14046-14051, 2011.

RIVERA, A. L.; GÓMEZ-LIM, M.; FERNÁNDEZ, F. & LOSKE, A. M. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*. 9: 308-345, 2012.

RUSHTON, P.J.; REINSTADLER, A.; LIPKA, V. & LIPPOK, B. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound induced signaling. *The Plant Cell*. 14:749–762, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p.1.74, 1989.

SAWANT, S.V.; KIRAN, K.; MEHROTRA, R.; CHATURVEDI, C.P.; ANSARI, S.A.; SINGH, P.; LODHI, N. & TULI, R. A variety of synergistic and antagonistic interactions mediated by *cis*-acting DNA motifs regulate gene expression in plant cells and modulate stability of the transcription complex formed on a basal promoter. *Journal of Experimental Botany*. 56:2345–2353, 2005.

SÉGUIN, A.; LAIBLE, G.; LEYVA, A.; DIXON, R.A. & LAMB, C.J. Characterization of a gene encoding a DNA-binding protein that interacts in vitro with vascular specific *cis* elements of the phenylalanine ammonia-lyase promoter. *Plant Molecular Biology*. 35:281-291, 1997.

SHAHMURADOV, I.A.; GAMMERMAN, A.J.; HANCOCK, J.M.; BRAMLEY, P.M. & SOLOVYEV, V.V. PlantProm: a database of plant promoter sequences. *Nucleic Acids Research*. 31: 114–117, 2003.

SHANER, N.C.; STEINBACH, P.A. & TSIEN, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*. 2:905–909, 2005.

SINGER, S.D.; COX, K.D. & LIU, Z. Enhancer-promoter interference and its prevention in transgenic plants. *Plant Cell Reporters*. 30: 723-731, 2011.

STEWART, C.N. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends in Biotechnology*. 24: 155-162, 2006.

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

THOMPSON, J.; HIGGINS, D. & GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680, 1994.



TWYMAN, R.M.; CHRISOTU, P. & STOGER, E. Genetic transformation of plants and their cells. In: Plant Biotechnology and Transgenic Plants. Marcel-Dekker Inc., NY, p. 111–141, 2002.

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

VENTER, M. & BOTHA, F.C. Synthetic promoter engineering. In: Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives. Volume 2, E-C Pua & M. R. Davey. Berlin, p. 393- 414, 2010.

VENTER, M. Synthetic promoters: genetic control through *cis* engineering. *Trends in Plant Science*. 12: 117-123, 2007.

VIJAYBHASKAR, V.; SUBBIAH, V.; KAUR, J.; VIJAYAKUMARI, P. & SIDDIQI, I. Identification of a root-specific glycosyltransferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. *Journal of Biosciences*. 33: 185–193, 2008.

WALTERS, M.C.; FIERING, S.; EIDEMILLER, J.; MAGIS, W.; GROUDINE, M. & MARTIN, D.I.K. Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92: 7125–7129, 1995.

WEINZIERL, R.O.J. Mechanism of gene expression. In: Imperial College Press, London. 1999.

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

WON, S.K.; LEE, Y.J.; LEE, H.Y.; HEO, Y.K.; CHO, M. & CHO, Y.T. *Cis*-element and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 150: 1459-1473, 2009.

WRAY, G.A.; HAHN, M.W.; ABOUHEIF, E.; BALHOFF, J.P.; PIZER, M.; ROCKMAN, M.V. & ROMANO, L.R. The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*. 20: 1377-1419, 2003.

XIAO, K.; ZHANG, C.; HARRISON, M. & WANG, Z. Isolation and characterization of a novel plant promoter that directs strong constitutive expression of transgenes in plants. *Molecular Breeding*. 15: 221-231, 2005.

YAMAMOTO, Y.Y.; ICHIDA, H. & MATSUI, M. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. *BMC Genomics*. 8: 8-67, 2007.

YAMAMOTO, Y. Y.; YOSHIOKA, Y.; HYAKUMACHI, M. & OBOKATA, J. Characteristics of core promoter types with respect to gene structure and expression in *Arabidopsis thaliana*. *DNA research*. 18: 333-342, 2011.

YOSHIDA, N. & SATO, M. Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83: 791-798, 2009.

ZARET, K. S., & CARROLL, J. S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & Development*. 25: 2227-2241, 2011.

ZHANG, X.; HENRIQUES, R.; LIN, S.S.; NIU, Q.W. & CHUA, N.H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*. 1:1-6, 2006.

ZHAO, Q.; WANG, G.; JI, J.; JIN, C.; WU, W. & ZHAO J. Over-expression of *Arabidopsis thaliana*  $\beta$ -carotene hydroxylase (*chyB*) gene enhances drought tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 23: 190-198, 2014.

ZHONG, R. & YE, Z.H. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*. 4: 1028-1034, 2009.

## 8. Curriculum vitae

### **SCALCO, C.**

#### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Camila Bedin Scalco

**Local e data de nascimento:** Antônio Prado, RS, Brasil em 07 de março de 1989.

**E-mail:** camilascalco@gmail.com

#### **2. FORMAÇÃO:**

Curso de Graduação

**Agronomia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de agosto de 2007 à fevereiro de 2013.

Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* (Mestrado)

**Biologia Celular e Molecular**, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de junho de 2013 à outubro de 2015.

#### **3. ESTÁGIOS:**

##### **Estágio voluntário**

Descoberta de novas enzimas de microrganismos para a produção de etanol celulósico

Orientação: Dr. Marcelo Gravina de Moraes

Local: UFRGS – Faculdade de Agronomia – Departamento de Fitossanidade - Laboratório de Fitopatologia Molecular.

Período: agosto de 2008 à abril de 2009

##### **Bolsista PIBIC/CNPq**

Criação do CDA Eucalyptus: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária Relativa a Plantas GM de Eucalipto

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Local: UFRGS – Centro de Biotecnologia – Laboratório de Biologia Molecular Vegetal.

Período: agosto de 2009 à julho de 2010

##### **Bolsista ITI/CNPq**

Criação do CDA Eucalyptus: Centro Colaborador em Defesa Agropecuária Relativa a Plantas GM de Eucalipto

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Local: UFRGS – Centro de Biotecnologia – Laboratório de Biologia Molecular Vegetal.

Período: agosto de 2010 à dezembro de 2011

#### **Estágio na área de planejamento e gestão agrícola**

Simulações de manejo de florestas e análise econômica (TIR, VPL, Pay Back), suporte no processo de inventário das fazendas, elaboração de mapas de crescimento anual, apoio na busca de informações técnicas junto a órgãos de pesquisa, acompanhamento e atualização do cadastro florestal.

Orientação: Dr. Lovois de Andrade Miguel

Local: Petropar Agroflorestal LTDA.

Período: janeiro à fevereiro de 2012

#### **Estágio na área de biologia molecular**

Técnicas de genotipagem e cultivo hidropônico de plantas

Orientação: Nancy Layland

Local: United States Department of Agriculture (USDA)

Período: 24 de setembro de 2012 à 08 de dezembro de 2012

### **4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR**

#### **Assistente de Pesquisa de Mercado no Setor de Apoio à Logística e Gestão da Oferta da Companhia Nacional de Abastecimento – Gerência de Desenvolvimento e Suporte Estratégico**

Pesquisa diária de preços e informações de *commodities* agrícolas. Elaboração de relatórios técnicos para divulgação. Pesquisas de mercado para embasamento de políticas agrícolas.

#### **Instrutura no Curso de Férias da UFRGS**

Projeto social que tem como objetivo aproximar a comunidade escolar do meio acadêmico e científico por meio de um curso de caráter prático. Realização de experimentos juntamente com os participantes para responder perguntas sobre um tema principal, além de outras atividades. O público alvo do curso são professores de ensino médio e fundamental e alunos do ensino médio, principalmente da rede pública.

### **5. RESUMOS EM ANAIS DE CONGRESSOS**

#### **IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011: “From Genomes to Integration and delivery”**

Resumo: "Evaluation of different versions of the gene encoding green fluorescent protein (GFP) in plants".