

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIANA DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO DE PROMOTOR DE *Eucalyptus grandis* EM *Nicotiana tabacum* E
TRANSFORMAÇÃO DE *Populus tremula* x *P. alba* COM O FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *CaHB12***

CURITIBA

2017

CASSIANA DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO DE PROMOTOR DE *Eucalyptus grandis* EM *Nicotiana tabacum* E
TRANSFORMAÇÃO DE *Populus tremula* x *P. alba* COM O FATOR DE
TRANSCRIÇÃO *CaHB12***

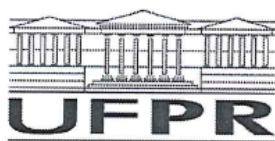
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin
Co-orientadora: Dr.^a Juliana Degenhardt-Goldbach

CURITIBA

2017

<p>o fator 2017. de Agronomia – Universidade Pós-</p>	<p>O48 Oliveira, Cassiana de Validação de promotor de <i>Eucalyptus grandis</i> em <i>Nicotiana tabacum</i> e transformação de <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> com de transcrição CaHB12 / Cassiana de Oliveira. Curitiba: 79 f. il. Orientadora: Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. 1. Tabaco. 2. <i>Eucalyptus grandis</i>. 3. Estresse hídrico. I. Quoirin, Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin. II. Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Graduação em Agronomia – Produção Vegetal. III. Título.</p>
	<p>CDU 674.031.776.2:633.71</p>



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CASSIANA DE OLIVEIRA** intitulada: **VALIDAÇÃO DE PROMOTOR DE *Eucalyptus grandis* EM *Nicotiana tabacum* E TRANSFORMAÇÃO DE *Populus alba* x *P. tremula* COM O FATOR DE TRANSCRIÇÃO *CaHB12***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 28 de Março de 2017.

MARGUERITE GERMAINE GHISLAINE QUOIRIN
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JOÃO CARLOS BERNALDO DE FIGUEIREDO FILHO
Avaliador Interno (UFPR)

MARILIA PEREIRA MACHADO
Avaliador Externo (UFPR)

JULIANA DEGENHARDT-GOLDBACH
Avaliador Externo (EMBRAPA)

GIOVANA BOMFIM DE ALCANTARA
Avaliador Externo (UFPR)

RESUMO

Plantas modelo são usadas para estudos de caracterização de genes e promotores, pois tem seus protocolos de transformação e regeneração definidos. *Nicotiana tabacum* e *Populus sp.* são exemplos de plantas modelo que são transformadas facilmente e eficientemente com um DNA exógeno. Neste trabalho foram usadas plantas de *Nicotiana tabacum* para validar o promotor *G02172* fusionado ao gene *gus* e plantas de *Populus tremula x P. alba* clone 717-1B4 foram transformadas para validar o fator de transcrição *CaHB12*. Em trabalhos anteriores, o promotor *G02172* foi isolado de *Eucalyptus grandis* e o gene deste promotor foi definido com expressão específica em raízes. Assim, plantas de tabaco transformadas com este promotor foram estudadas a fim de validar a expressão específica nas raízes. Dez eventos com o promotor *G02172* e um com o promotor *CaMV35S*, ambos fusionados ao gene *gus* e ao gene *gfp*, foram analisados via PCR. Em seguida, foi realizado o teste histoquímico e de quantificação do gene *gus* para a visualização da atividade da enzima β -glucuronidase. A presença da proteína não foi específica nas raízes do tabaco, no entanto houve maior expressão do gene *gus* nas raízes e nos caules. Portanto, o promotor *G02172* foi considerado um promotor preferencialmente expresso em caules e raízes em *Nicotiana tabacum*. Um segundo estudo de validação foi realizado usando o fator de transcrição *CaHB12* da família HD-Zip-I em plantas de *Populus tremula x P. alba* clone 717-1B4. Este fator de transcrição foi isolado de *Coffea arabica* e está envolvido na resposta a tolerância à seca. Foram verificados via PCR oito eventos contendo o gene *CaHB12*. Em seguida, foi realizado o Southern Blot que permitiu estabelecer que quatro dos oito eventos eram o mesmo evento e que tinham duas cópias do gene *CaHB12*. O evento 1 e plantas não transformadas foram submetidos ao estresse osmótico *in vitro*. Estas plantas foram mantidas em meio de cultura MS suplementado com 300 mM de manitol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Após 60 dias, observou-se o melhor desenvolvimento dos eventos do que as plantas controle. Estas plantas foram usadas para extração e quantificação de prolina. Não houve diferença estatística na quantidade de prolina entre o evento e o controle. Três eventos foram aclimatizados e avaliados morfológicamente, e após 60 dias, não houve diferenças estatísticas entre eles mostrando que o fenótipo das plantas se manteve inalterado. Dois regimes de estresse hídrico foram aplicados aos três eventos aclimatizados e aos controles. No primeiro regime, houve um estresse severo onde foi cessada a rega por 15 dias e todas as plantas morreram. No segundo, foi realizado um estresse moderado com uma rega semanal. Após 15 dias, estas plantas foram avaliadas para número de folhas, comprimento e largura de folhas. Houve diferenças estatísticas entre os resultados, sendo que as plantas controle sempre obtiveram as médias menores. Assim, pode-se concluir que o fator de transcrição *CaHB12* teve influência positiva na tolerância à seca de plantas de *Populus tremula x P. alba* clone 717-1B4.

Palavras-chave: HD-Zip-I, tolerância à seca, promotor raiz-específico.

ABSTRACT

Model plants are used for characterization studies of genes and promoters, as they have their transformation and regeneration protocols well defined. *Nicotiana tabacum* and *Populus sp.* are examples of model plants that are easily and efficiently with an exogenous DNA transformed. In this study, *Nicotiana tabacum* plants were used to validate the *G02172* promoter fused to the *gus* gene and plants of *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 were transformed to validate the transcription factor *CaHB12*. In a previous study, the *G02172* promoter was isolated from *Eucalyptus grandis* and it was shown that the promoter gene was specifically expressed in roots. Thus, tobacco plants transformed with this promoter were studied in order to validate the specific expression in the roots. Ten events with the *G02172* promoter and one with the *CaMV35S* promoter, both fused to the *gus* gene and the *gfp* gene, were analyzed via PCR. Next, the histochemical and quantification test of the *gus* gene was performed to visualize the activity of the enzyme β -glucuronidase. The presence of the protein was not specific in the tobacco roots; however there was a greater expression of the *gus* gene in the roots and stems. Therefore, the *G02172* promoter was considered a promoter preferentially expressed in stems and roots in *Nicotiana tabacum*. A second validation study was performed using the *CaHB12* transcription factor of the HD-Zip-I family in plants of *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4. This transcription factor was isolated from *Coffea arabica* and is involved in the response to drought tolerance. Eight events containing the *CaHB12* gene were verified via PCR. Southern Blot was then performed to establish that four of the eight events were the same event and had two copies of the *CaHB12* gene. Event 1 and untransformed plants were submitted to osmotic stress *in vitro*. These plants were maintained in MS culture medium supplemented with 300 mM mannitol, 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. After 60 days, the events had a better development than the control plants. These plants were used for extraction and quantification of proline. There was no statistical difference in the amount of proline between the event and the control. Three events were acclimatized and evaluated morphologically and, after 60 days, there were no statistical differences between them showing that the plant phenotype remained unchanged. Two water stress regimes were applied to the three acclimatized events and control plants. In the first regime when a severe stress was applied, with watering stopped for 15 days, all the plants died. In the second regime, a moderate stress was carried out with a weekly irrigation. After 15 days, these plants were evaluated for leaf number, length and width. There were statistical differences between the results, and the control plants always obtained the smaller means. Thus, it can be concluded that the transcription factor *CaHB12* had a positive influence on the drought tolerance of plants of *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4.

Key words: HD-Zip-I, drought tolerance, root-specific promoter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura básica de um gene eucarioto.....	15
Figura 2.	Fatores de transcrição fazendo a regulação do início da transcrição.....	21
Figura 3.	T-DNA do plasmídeo pCAMBIA1303 B21 utilizado na transformação genética de <i>Nicotiana tabacum</i> (GRUNENVALDT, 2014). LB: Borda esquerda do T-DNA; 35S-P: Promotor <i>CaMV35S</i> (vírus do Mosaico da Couve-Flor); <i>HygR</i> : gene que confere resistência ao antibiótico higromicina; 35S-3': Terminador do <i>CaMV35S</i> ; 2172-P: Promotor <i>G02172</i> ; GUS: gene repórter que codifica a enzima β -glucuronidase; GFP: gene repórter que codifica a proteína verde fluorescente; NOS-3': Terminador da nopalina sintetase; RB: Borda direita do T-DNA.....	36
Figura 4.	Eletroforese dos produtos de PCR realizados com o DNA de <i>Nicotiana tabacum</i> com os primers do promotor <i>G02172</i> (A) e do gene <i>gus</i> (B). M: Marcador de peso molecular com 10 kb MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1A – 11: Eventos confirmados. P: Controle positivo; N: Controle negativo. Os produtos esperados de 1 kb (promotor <i>G02172</i>) e de 400 pb (<i>gus</i>) foram observados em todas as amostras analisadas (com exceção do tabaco não transformado).....	42
Figura 5.	Eventos de <i>Nicotiana tabacum</i> transformados com o promotor <i>G02172</i> (A-K) e com o promotor <i>CaMV35S</i> (L), ambos dirigindo o gene <i>gus</i> . M: Tabaco não transformado (controle negativo).....	44
Figura 6.	Atividade da enzima GUS nas raízes, caule e folhas dos eventos de <i>Nicotiana tabacum</i> transformados com o gene <i>gus</i> sob controle do promotor <i>G02172</i> (1A,1B, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11) e do promotor <i>CaMV35S</i>	45
Figura 7.	Teste histoquímico de GUS nas folhas da geração T1 de <i>Nicotiana tabacum</i> transformados com promotor <i>G02172</i> fusionado ao gene <i>gus</i> germinadas em meio de cultura MS suplementado com 30 g L ⁻¹ de sacarose, 7 g L ⁻¹ de ágar e 40 mg L ⁻¹ de higromicina. A: T1 do evento 2; B: T1 do evento 4; C: T1 do evento 7. Barra = 1 cm.....	49
Figura 8.	Eletroforese dos produtos de PCR realizados com o DNA da geração T1 de <i>Nicotiana tabacum</i> com os primers do promotor <i>G02172</i> . M: Marcador de peso molecular com 100 kb MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 2, 4, 7 e 10: Eventos confirmados; P: Controle positivo.....	49
Figura 9.	T-DNA do plasmídeo pUCECaHB12 utilizado na transformação genética de <i>Populus tremula x P. alba</i> . LB: Borda esquerda do T-DNA; 35S-P: Promotor <i>CaMV35S</i> (vírus do Mosaico da Couve-Flor); <i>CaHB12</i> : fator de transcrição de resistência a seca; <i>AHAS</i> : gene que confere resistência ao herbicida imazapir; 35S-3': Terminador do <i>CaMV35S</i> ; RB: Borda direita do T-DNA.....	58
Figura 10.	Resultados das eletroforeses dos produtos de PCR realizadas com o DNA de <i>Populus tremula x P. alba</i> clone 717-1B4 transformados com o gene <i>CaHB12</i> . M: Marcador de peso molecular com 10kb	

	MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1, 2A, 2B, 2C, 2D e 3: Eventos confirmados. P: Controle positivo; N: Controle negativo. Setas indicam a banda do gene <i>CaHB12</i>	64
Figura 11.	Gel de eletroforese com a sonda marcada e o fragmento do plasmídeo pUCECaHB12. M: Marcador Ladder com 1kpb; S: PCR com a sonda; C: PCR sem sonda como controle.....	65
Figura 12.	Análise de Southern Blot do DNA dos eventos 2A, 2B, 2C e 2D de <i>Populus tremula x P. alba</i> clone 717-1B4 transformados com o gene <i>CaHB12</i>	65
Figura 13.	Brotos de <i>Populus tremula x P. alba</i> clone 717-1B4 cultivos <i>in vitro</i> em meio de cultura MS suplementado com 30 g L ⁻¹ de sacarose, 7 g L ⁻¹ de ágar e 300 mM de manitol. A: Início do experimento, foram utilizados segmentos nodais com duas gemas como explante inicial; B: Broto controle não transformado com 60 dias em meio contendo manitol; C: Evento 1 transformado com o gene <i>CaHB12</i> com 60 dias em meio contendo manitol. Barra = 1 cm.....	67
Figura 14.	Plantas de <i>Populus tremula x P. alba</i> clone 717-1B4 sob estresse hídrico severo, com 15 dias sem rega. 1, 2A, 3: Eventos transformados com o gene <i>CaHB12</i> . C: Controle não transformado. A: Plantas no início do experimento; B: Plantas sob estresse hídrico após 15 dias. Barra = 5 cm.....	69
Figura 15.	Plantas de <i>Populus tremula x P. alba</i> clone 717-1B4 sob estresse hídrico moderado. 1, 2A, 3: Eventos transformados com o gene <i>CaHB12</i> . C: Controle não transformado. A: Plantas no início do experimento; B: Plantas sob estresse hídrico após 15 dias. Barra = 5 cm.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Análise morfológica de <i>Nicotiana tabacum</i> não transformado (controle), transformados com o promotor <i>G02172</i> (1A, 1B, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11) e transformado com o promotor <i>CaMV35S</i> . Valores da média das repetições.....	47
Tabela 2.	Germinação <i>in vitro</i> das sementes de <i>Nicotiana tabacum</i> não transformado (controle), transformado com o promotor <i>G02172</i> (1A, 1B, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11) e transformado com o promotor <i>CaMV35S</i> na presença de 40 mg L ⁻¹ de higromicina.....	48
Tabela 3.	Avaliação do evento 1 de <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> clone 717-1B4 transformado com o gene <i>CaHB12</i> e do controle não transformado após cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura MS suplementado com 300 mM de manitol 30 g L ⁻¹ de sacarose e 7 g L ⁻¹ de ágar.....	67
Tabela 4.	Avaliação morfológica dos eventos 1, 2A e 3 transformados com o gene <i>CaHB12</i> e do controle não transformado de <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> clone 717-1B4 avaliados após 60 dias de aclimatização.....	68
Tabela 5.	Avaliação morfológica dos eventos 1, 2A e 3 transformados com o gene <i>CaHB12</i> e do controle não transformado de <i>Populus tremula</i> x <i>P. alba</i> clone 717-1B4 sob estresse hídrico moderado avaliados após 15 dias.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	- Ácido abscísico
AIA	- Ácido 3-indol-acético
ANA	- Ácido naftalenoacético
BAP	- 6-benzilaminopurina
CaMV 35S	- Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
cDNA	- DNA complementar
CQB	- Certificado de Qualidade em Biossegurança
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTP	- Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	- Densidade ótica
FT	- Fator de transcrição
GA	- Giberelina
<i>gfp</i>	- Gene codificante da proteína verde fluorescente
<i>gus</i>	- Gene codificante da enzima β -glucuronidase
GUS	- Enzima β -glucuronidase
<i>hptII</i>	- Gene da higromicina fosfotransferase
Kb	- Kilobases
MS	- Meio de Murashige e Skoog (1962)
MSA	- Meio MS modificado
MU	- 4-metil-umbeliferone
MUG	- 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PEG	- Polietilenoglicol
RNA	- Ácido ribonucleico
rpm	- Rotações por minuto
Taq	- DNA polimerase termoestável proveniente da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	- DNA de transferência
X-gluc	- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS MODELO	13
2.2	PROMOTORES.....	14
2.2.1	<i>Promotores raiz-específicos</i>	16
2.4	FATORES DE TRANSCRIÇÃO	20
2.5	A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E O GENE <i>CAHB12</i>	21
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
3	VALIDAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>G02172</i> DE <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i> EM <i>NICOTIANA TABACUM</i>	31
	RESUMO	31
3	VALIDATION OF A ROOT-SPECIFIC PROMOTER OF <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i> IN <i>NICOTIANA TABACUM</i>	32
	ABSTRACT	32
3.1	INTRODUÇÃO	33
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.2.1	TRANSFORMAÇÃO DE <i>NICOTIANA TABACUM</i> COM O PROMOTOR <i>G02172</i>	35
3.2.2	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA	36
3.2.3	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO TRANSGENE	36
3.2.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>GUS</i> PELO TESTE HISTOQUÍMICO	37
3.2.5	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DA ENZIMA β -GLUCURONIDASE (<i>GUS</i>)	37
3.2.6	ACLIMATIZAÇÃO	38
3.2.7	ANÁLISES MORFOLÓGICAS	38
3.2.8	GERMINAÇÃO DAS SEMENTES T1 NA PRESENÇA DE HIGROMICINA	39
3.2.9	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO TRANSGENE DA GERAÇÃO T1	39
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.4	CONCLUSÃO	49
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

4	TRANSFORMAÇÃO DE <i>POPULUS TREMULA</i> X <i>P. ALBA</i> CLONE 717-1B4 COM O FATOR DE TRANSCRIÇÃO <i>CAHB12</i> DE TOLERÂNCIA À SECA	52
	RESUMO	52
4	GENETIC TRANSFORMATION OF <i>POPULUS TREMULA</i> X <i>P. ALBA</i> WITH FACTOR TRANSCRIPTION <i>CAHB12</i> TOLERANCE TO DROUGHT	53
	ABSTRACT	53
4.1	INTRODUÇÃO	54
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.2.1	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA	56
4.2.3	TRANSFORMAÇÃO DE <i>POPULUS TREMULA</i> X <i>P. ALBA</i> VIA <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	56
4.2.3.1	<i>Cepa bacteriana e vetor binário</i>	56
4.2.3.2	<i>Condições de cultura da bactéria, inoculação e co-cultura</i>	57
4.3.4	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO DO TRANSGENE	58
4.3.5	ANÁLISE DE SOUTHERN BLOT	58
4.3.5.1	<i>Preparo da Sonda</i>	59
4.3.6	ESTRESSE OSMÓTICO <i>IN VITRO</i>	60
4.3.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROLINA	60
4.3.8	ACLIMATIZAÇÃO	61
4.3.9	ANÁLISE MORFOLÓGICA	61
4.3.10	ESTRESSE HÍDRICO SEVERO	61
4.3.11	ESTRESSE HÍDRICO MODERADO	61
4.3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.5	CONCLUSÃO	71
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	75
6	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO GERAL

A obtenção de espécies perenes com características desejáveis através da produção de plantas geneticamente modificadas tem sido apontada como um complemento ao melhoramento clássico. A identificação e a validação de genes que conferem resistência a fatores bióticos e abióticos têm ampliado as possibilidades de manipulações por processos biotecnológicos (BRANDALISE, 2009). No entanto, ainda não é possível transformar algumas espécies importantes economicamente sendo necessário o uso de plantas modelo para as pesquisas de transgenia (FOSTER; TAYLOR, 1998). Ainda de acordo com esses autores, plantas modelo são definidas como plantas que são transformadas geneticamente de maneira simples e eficientemente com um DNA exógeno.

Nicotiana tabacum e *Populus sp.* são exemplos de plantas modelo utilizadas para estudos de caracterização de genes e promotores. Ambas tem protocolos de transformação e regeneração *in vitro* bem definidos. O tabaco tem um ciclo de vida curto e produz um grande número de sementes, além de ter seu genoma totalmente sequenciado. O *Populus* é utilizado como planta modelo de espécies florestais, pois apresenta um genoma pequeno e totalmente sequenciado, além de facilidade na manipulação *in vitro*. *Populus* foi a primeira árvore transgênica obtida (FILLATTI *et al.*, 1987).

A escolha das sequências promotoras para a modulação da expressão de genes em plantas é um fator essencial na determinação da especificidade de tecido, da regulação temporal e do nível de acúmulo de proteínas recombinantes em uma planta (MAIZEL; WEIGEL, 2004). O conhecimento desses promotores é importante já que se espera que, ao menos em parte, semelhanças nas regiões envolvidas na regulação da transcrição determinem padrões similares de expressão em diferentes espécies (OHLER e NIEMANN, 2001).

Os promotores podem ser classificados em constitutivos, induzíveis e tecido/órgão específico. Os promotores constitutivos promovem a expressão do gene em toda a planta e durante toda sua vida; os promotores induzíveis regulam a expressão quando ocorre um estímulo ambiental ou endógeno, como na presença de hormônios ou ferimentos; os promotores tecido/órgão específicos dirigem a expressão do gene somente em um tecido ou em um órgão da planta. O uso de

promotores órgãos específicos em detrimento de promotores constitutivos para expressar transgenes restringe sua expressão espacial, aumentando a biossegurança e estabilidade do sistema, além da economia de energia da planta (SANTANA, 2012). Os cassetes de expressão empregados atualmente para a produção de plantas geneticamente modificadas são baseados, na sua maioria, em promotores constitutivos que determinam a expressão generalizada do transgene na planta, o que muitas vezes não é necessário nem desejado.

O promotor *G02172* foi isolado do gene *Eucgr.G02172* de *Eucalyptus grandis* (GRUNENVALDT, 2014). A expressão desse gene foi encontrada somente nas raízes do eucalipto, enquanto que não foi identificada no xilema, floema e folhas jovens e maduras de eucalipto, sugerindo uma expressão raiz específica. Este gene apresenta um domínio proteico característico de proteínas relacionadas a patogênese (*Pathogenesis-related protein Bet v I family*) (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008). Assim, o promotor *G02172* seria uma opção viável como promotor raiz-específico dirigindo genes de resistência a patógenos ou a estresse hídrico, por exemplo. Para tanto, é necessário validá-lo a fim de comprovar sua especificidade. Assim, neste trabalho foram estudadas plantas de *N. tabacum* transformadas com o promotor *G02172* dirigindo o gene *gus* e o gene *gfp*.

O estudo da funcionalidade dos genes de interesse em plantas modelo auxilia na compreensão de suas funções, fazendo com que se escolham os genes adequados para a produção de plantas transgênicas importantes economicamente. Uma das características nas quais mais se tem interesse é a tolerância ao estresse hídrico, devido a atual e futura escassez de água. Sabe-se que essa característica é poligênica, ou seja, vários genes precisam ser expressos para que a planta tenha tolerância à seca. Assim, atualmente, os estudos de fatores de transcrição têm aumentado, já que estes dão início à transcrição de uma cascata de genes.

O fator de transcrição *CaHB12*, isolado de *Coffea arabica*, tem seu padrão de expressão modulado pela condição de déficit hídrico (CRUZ *et al.*, 2007). A expressão deste gene foi baixa quando as plantas de café estavam em condições normais de cultivo em casa de vegetação, sendo induzida gradativamente em condições de déficit hídrico (EMBRAPA, 2012). Em estudos com *Arabidopsis thaliana* transformado com esse gene, houve aumento da sua expressão quando as plantas passaram por estresse hídrico (EMBRAPA, 2012). O gene *CaHB12* é homólogo ao gene *AtHB12*, isolado de *A. thaliana*, o qual foi alvo de estudos de

estresse hídrico. A expressão de *AtHB12* aumentou quando as plantas de *A. thaliana* foram submetidas a estresse hídrico e quando foi adicionado ABA (ácido abscísico) no meio de cultura, mostrando que este gene está envolvido na resposta ao déficit hídrico (LEE; CHUN, 1998). Plantas de *N. tabacum* foram transformadas com o promotor do gene *AtHB12* dirigindo o gene *gus* e houve presença da proteína GUS nas regiões dos tecidos vasculares em desenvolvimento, sugerindo que *AtHB12* é um ativador transcricional importante na regulação de certos processos de desenvolvimento das plantas, bem como na resposta ao estresse hídrico, sendo essa expressão mediada por ABA (LEE *et al.*, 2001). Portanto, sendo o gene *CaHB12* homólogo ao *AtHB12*, há muito interesse na sua utilização para resposta ao estresse hídrico e, para isso, neste trabalho, este gene foi inserido em *Populus tremula* x *P. alba* e estudado nesta planta modelo.

O objetivo deste trabalho foi estudar plantas de *N. tabacum* transformadas com o promotor *G02172* a fim de validá-lo e transformar plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 com o fator de transcrição *CaHB12* e comprovar sua influência na tolerância à seca dessas plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Transformação Genética de Plantas Modelo

Dificuldades na transformação genética utilizando *Agrobacterium tumefaciens* têm sido reportadas em muitas espécies, principalmente em espécies florestais. Os principais problemas são encontrados no cultivo de tecidos *in vitro*, como a recalitrância de várias espécies florestais ao cultivo *in vitro* e a contaminação por micro-organismos (tanto exógena quanto endógena), representando limitações ao estabelecimento das culturas em condições *in vitro* (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Assim, o estudo de genes e promotores de interesse é facilitado com o uso de plantas modelo, que não apresentam problemas de regeneração *in vitro*, para futura inserção em plantas de interesse. Há uma correlação positiva entre a resposta observada nas plantas modelo e na espécie alvo em diversos aspectos na maioria das vezes (MEINKE *et al.*, 1998).

As plantas modelo são muito utilizadas para estudos fisiológicos e genéticos, já que permitem o entendimento dos processos biológicos, a determinação da função gênica e a análise de genes e promotores (FERRARI, 2012). Para tanto, estas plantas possuem características adequadas, como curto tempo de geração, eficiência dos protocolos de transformação, pouco espaço requerido para a reprodução de plantas transgênicas cultivadas, além de informações disponíveis acerca do seu genoma. *A. thaliana* (L.) Heynh e *Nicotiana tabacum* são as plantas modelo mais utilizadas para pesquisas básicas (SIERRO *et al.*, 2014). Além destas, *Populus sp.* tem sido utilizado como uma planta modelo para estudo de espécie florestais.

O tabaco oferece inúmeras vantagens como planta modelo, como o seu curto ciclo de vida (4-5 meses), dados do seu genoma completo (4,4 Gb) já disponíveis (Tobacco Genome Initiative of the North Carolina State University - <http://www.tobaccogenome.org>), facilidades no protocolo de transformação, na obtenção de transformantes e grande quantidade de sementes por cápsula (BRASILEIRO, 1998; PEREIRA, 2014).

Populus sp. é conhecido como a *Arabidopsis* das espécies florestais, por ter maior facilidade na regeneração *in vitro* (TAYLOR, 2002). Além disso, o genoma do *Populus* é pequeno (450-550 Mb), quando comparado ao de outras espécies

florestais, como *Pinus*, por exemplo, que possui 20.000 Mb. Outra vantagem do uso do *Populus* como planta modelo é a facilidade de aclimatização, etapa fundamental para validação de genes e promotores. Por todas essas características, *Populus* foi a primeira árvore transformada, sendo introduzido o gene *aroA* que confere resistência ao herbicida glifosato (FILLATI *et al.*, 1987).

Além de plantas com facilidade de transformação, para validação de genes e promotores é importante o uso de genes repórter que são genes que tem sua expressão facilmente visualizada. Os genes repórter mais usados são o *gus* (também conhecido como *uidA*) e *gfp*. O gene *gfp* codifica a proteína GFP (Green Fluorescent Protein) que, quando iluminada por uma luz UV, produz uma coloração verde brilhante nas células transformadas. Já o gene *gus* codifica a enzima β -glucuronidase (GUS) que, em contato com 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucuronídeo (x-Gluc), produz precipitados azuis (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987).

2.2 Promotores

O gene é constituído basicamente por uma região promotora, uma região codificadora e uma terminadora (Figura 1). A região promotora é o processador central da regulação gênica, que contém os sítios para a ligação de fatores de transcrição e para a RNA polimerase II, responsáveis pela transcrição gênica (BRANDALISE *et al.*, 2002). Além disso, o promotor de um gene eucarioto compreende a região 5' da sequência transcrita e uma sequência conservada denominada TATA-box (FERRARI, 2012). O promotor possui também uma região de elementos regulatórios cis que determina a especificidade para um complexo transcricional distinto e para outros elementos regulatórios mais distais, como os *enhancers* (BUTLER; KADONAGA, 2002), que podem gerar diferentes respostas de transcrição em diferentes plantas. Portanto, o promotor não pode ser considerado um elemento passivo tendo como única função direcionar o acoplamento correto da maquinaria de transcrição da RNA polimerase II (SASSAKI, 2008). Assim, os promotores são uma ferramenta importante na transformação genética para que a expressão de um gene de interesse seja efetiva e regulada.

Dentre os promotores usualmente empregados na produção de plantas transgênicas destacam-se o promotor 35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor (CaMV 35S) e os promotores dos genes que codificam a nopalina sintetase (NOS) e

octopina sintetase (OCS) de *Agrobacterium tumefaciens* (BRANDALISE, 2007). Estes promotores são conhecidos como constitutivos já que promovem expressão em todas as partes da planta e durante toda sua vida. Os promotores constitutivos são amplamente utilizados visando uma super-expressão dos genes de interesse nas plantas transgênicas. Estes promotores são úteis quando níveis elevados de expressão do transgene são necessários de uma forma contínua durante toda a vida da planta (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

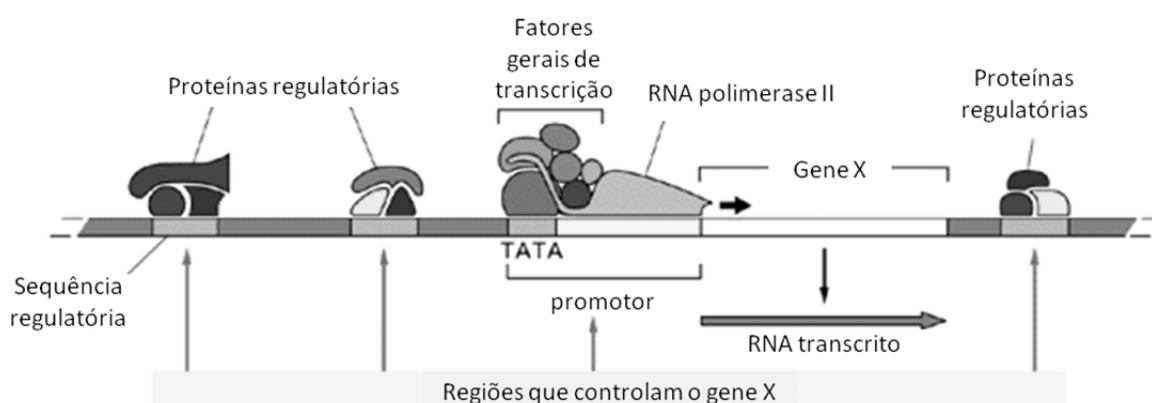


Figura 1. Estrutura básica de um gene eucariótico. Fonte: Modificado de Alberts *et al.*, 2006.

A expressão do gene dirigido por um promotor constitutivo ocorre, na maioria dos tecidos, sem regulação temporal ou espacial, o que pode provocar um crescimento anormal da planta (LU; ZHAO; JIANG, 2004). Diversos autores mostraram que a expressão constitutiva de um gene pode ser prejudicial para a planta hospedeira causando esterilidade, desenvolvimento retardado, morfologia anormal, diminuição na produtividade, alterações na composição de grãos e silenciamento do transgene (KUREK *et al.*, 2002; CHEON *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2006).

Há, ainda, os promotores tecido/órgão específicos e os induzíveis por sinais bióticos ou abióticos. Os promotores induzíveis permitem a expressão do gene dirigido na presença ou na ausência de estímulos físicos ou químicos, como ferimentos ou invasão por patógenos (BOETTI *et al.*, 1999). Um exemplo de promotor induzível foi descrito por Preiszner *et al.* (2001), o promotor do gene da enzima álcool desidrogenase *Adh2*, capaz de gerar a expressão de genes repórteres em raízes de soja submetidas à anóxia ou seja, na ausência de oxigênio.

Já os promotores tecido/órgão-específicos são opções viáveis para a regulação espaço-temporal dos transgenes inseridos, pois dirigem a expressão a somente um tecido ou órgão. Assim, o uso destes promotores diminui o gasto energético desnecessário e aumenta a biossegurança, já que se pode direcionar a expressão para órgãos que não serão usados no consumo humano ou animal e para órgãos não-reprodutores. Promotores de expressão específica têm sido estudados intensivamente nos últimos anos devido à sua importância na expressão de genes, desenvolvimento e crescimento de plantas transgênicas. Embora um grande número de promotores tecidos específicos tenha sido identificado, promotores com uma forte expressão específica em tecido ou órgão que podem ser usados para o desenvolvimento das culturas são limitados (LU; ZHAO; JIANG, 2004). Um exemplo clássico de uso de promotores tecido/órgão específicos é a expressão de proteínas antimicrobianas e inseticidas somente nos órgãos atingidos pela infecção ou infestação, evitando assim que os órgãos utilizados para consumo humano ou animal tenham tais proteínas (VIJAYBHASKAR *et al.*, 2008).

2.2.1 Promotores raiz-específicos

Promotores raiz-específicos direcionam a expressão gênica apenas às raízes das plantas, as quais podem ser usadas para biorremediação de solos contaminados, resistência a patógenos de raízes, proteção contra o estresse hídrico, aumento da tolerância a solos salinos, entre outros usos (POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA-GOPALAN, 2004). O uso desses promotores poderá diminuir os problemas causados pela expressão constitutiva de transgenes que podem gerar, por exemplo, efeitos pleiotrópicos indesejados (SASSAKI, 2008).

Exemplos de promotores raiz-específicos já existem em diversos trabalhos. Yamamoto *et al.* (1991) analisaram o promotor *TobRB7* isolado de raízes de *N. tabacum*. Através da detecção do RNA por hibridização, estes autores não encontraram mRNA em folhas expandidas, ápice caulinar e no caule. Para comprovar a especificidade do promotor, eles transformaram plantas de tabaco com esse promotor dirigindo o gene *gus* e a expressão deste gene foi identificada somente no meristema radicular e regiões do cilindro central imaturo das raízes (YAMAMOTO *et al.*, 1991).

Leach e Aoyagi (1991) isolaram o promotor do gene *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* responsável pela indução das raízes em cabeleira e transformaram *N. tabacum* com este promotor dirigindo o gene *gus*. Estes autores obtiveram, pelo teste histoquímico, alta expressão nas raízes e pouca expressão nas folhas dos tabacos transformados. Quando este promotor dirigindo o gene *GS15* da glutamina sintase foi usado para transformar ervilhas, houve maior expressão do gene em raízes usando o promotor *rolD* do que os promotores *CaMV35S* e *LBC3* (FEI *et al.*, 2003). Houve também alta expressão do gene *NpNRT2.1* em raízes usando o promotor *rolD* (FRAISIER *et al.*, 2000). Elmayan e Tepfer (1995) transformaram tabaco com o promotor *rolD* dirigindo o gene *gus*, obtendo uma forte expressão do gene na zona de alongamento da raiz e no tecido vascular e uma expressão mais fraca no ápice da raiz. Outro promotor que não tem sua origem em plantas, é o Domínio A (290 pb *upstream*) do promotor viral *CaMV35S* (BENFEY; CHUA, 1989 apud POTENZA; ALEMAN; SENGUPTA, 2004). O promotor Domínio A dirigindo o gene *gus* em plantas de tabaco transformadas provocou expressão do gene *gus* em pontas de raízes (ELMAYAN; TEPFER, 1995).

Nitz *et al.* (2001) descreveram o gene *pyk10* de *Arabidopsis thaliana* e seu promotor como específicos de raiz. Inicialmente, estes autores utilizaram a técnica de Northern Blot e identificaram a presença da enzima produzida pelo gene *pyk10* somente nas raízes de *A. thaliana*. Em seguida, construíram cassetes de expressão usando diferentes tamanhos do promotor *pyk10* dirigindo o gene *gus* e inseriram em *A. thaliana*. Os elementos CIS que regulam a expressão específica em raízes foram encontrados em dois fragmentos do promotor.

Os promotores *MtPT1* e *MtPT2* foram isolados de genes transportadores de fosfato de *Medicago truncatula* (CHIOU *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2006). Estes promotores foram usados para transformar *N. benthamiana* com o gene *gfp*, onde foi observada a presença da fluorescência verde somente nas raízes das plantas.

O promotor *SIREO* isolado de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), apresenta uma expressão específica nas raízes (JONES *et al.*, 2008). Quando foi utilizado este promotor dirigindo o gene *gus*, foi obtida uma alta expressão no córtex das raízes de tomate transformadas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O promotor *RCc3*, isolado de *Oryza sativa*, apresenta uma expressão específica em raízes de plantas de arroz transformadas (JEONG *et al.*, 2010).

O promotor do gene *CaPrx*, que codifica a peroxidase III em *Coffea arabica*, dirigindo o gene *gus*, promoveu a expressão desse gene somente em raízes de tabaco transgênicas. Além da expressão órgão específica, este promotor se mostrou induzível, já que aumentou a expressão do gene *gus* quando as plantas de tabaco transformadas foram atacadas por nematoides (SEVERINO *et al.*, 2012).

Os genes *Os03g01700* e *Os02g37190*, isolados de arroz (*Oryza sativa* L.), foram analisados através da técnica de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) e apresentaram altos níveis de expressão nas raízes de arroz quando comparados com outros quatro genes constitutivos (LI *et al.*, 2013). Estes mesmos autores utilizaram, então, os promotores destes genes dirigindo o gene *gus* para transformar arroz e obtiveram altas taxas de expressão nas raízes.

O promotor *GmPRP2*, isolado de soja, dirige sua expressão preferencialmente para as raízes. Além da expressão nas raízes, ele aumentou a expressão do gene *gus* em plantas de *Arabidopsis* transformadas submetidas a tratamentos com NaCl, PEG (polietilenoglicol), AIA (ácido 3-indol-acético) e jasmonato (CHEN *et al.*, 2014). O promotor *GmTIP* também foi isolado de soja e inserido em *A. thaliana* com o gene *gus*. Este promotor foi isolado de um gene de proteína do tonoplasto (*tonoplast intrinsic protein* ou TIP), teve uma expressão específica nas raízes das plantas transformadas, além de um aumento desta expressão na presença de jasmonato, ácido salicílico, ABA, GA (ácido giberélico), AIA, NaCl e PEG6000 (CHEN; JIANG; WU, 2015).

Outros exemplos de promotores raiz específicos são os promotores *rRSP1*, *rRSP3* e *rRSP5* que foram isolados de arroz (HUANG *et al.*, 2015). Estes autores inseriram estes promotores dirigindo o gene *gus* em arroz e obtiveram maior expressão nas raízes das plantas transformadas.

O promotor *OsNAC2* também foi isolado de arroz e apresentou expressão raiz específica além de um aumento da expressão quando as plantas de arroz transformadas com o gene *gus* foram submetidas a estresse osmótico e a ABA (SHEN *et al.*, 2017).

Lv e Zhang (2016) isolaram dois genes de macieira (*Malus domestica*) e, usando ferramentas de bioinformática, clonaram, sequenciaram e analisaram seus promotores. Os autores transformaram *A. thaliana* usando os promotores dirigindo o gene *gus* e obtiveram raízes expressando esse gene usando o promotor *MdHMGR4*. Assim, o promotor *MdHMGR4* foi validado como promotor específico de raízes.

O promotor *AtDRO1*, isolado do gene *DRO1* de *A. thaliana*, foi fusionado com o gene *gus* e inserido em plantas de *A. thaliana*, as quais foram submetidas ao teste histoquímico onde somente as raízes das plantas transformadas apresentaram coloração azul (GUSEMAN *et al.*, 2016).

Alguns promotores específicos de raízes isolados de espécies florestais também já foram estudados. Através da RT-PCR, a expressão do gene *PmPR10-1.14* foi detectada somente em raízes laterais de pinus (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don) (LIU; EKRAMODDOULLAH, 2003). Esses autores isolaram o promotor do gene *PmPR10-1.14* e cortaram a sequência em diferentes tamanhos a fim de identificar o núcleo do promotor e investigar se, cortando-o, mantinha-se a expressão específica nas raízes de tabaco transformado com o promotor dirigindo o gene *gus*. Estes autores identificaram as regiões que agem como *enhancers* e as regiões que agem como silenciadores. Além disso, concluíram que a região mais próxima do núcleo do promotor é a que promove a expressão específica nas raízes; no entanto, nas regiões mais distantes esta expressão aumentou.

Rodrigues *et al.* (2013) investigaram o promotor *EgTIP2* que foi isolado de *Eucalyptus grandis*. Um cassete de expressão contendo o promotor *EgTIP2* dirigindo o gene *gus* foi inserido em plantas de *N. tabacum* e houve maior expressão nas pontas das raízes (RODRIGUES *et al.*, 2013). Além deste resultado, os mesmos autores demonstraram que o promotor *EgTIP2* aumentou a expressão do *gus* quando as plantas foram tratadas com manitol.

O promotor do gene *ET304*, isolado de *Populus trichocarpa* e foi inserido em *Populus* e em *A. thaliana* fusionado com o gene *gus*. Houve expressão nos primórdios das raízes laterais, no meristema apical, na zona de alongamento e no córtex das raízes (FILICHKIN *et al.*, 2006). Este promotor também foi usado para dirigir o gene *PtaNAC1* em plantas de *Populus* transgênicas, onde manteve a expressão específica do gene nas raízes (WEI *et al.*, 2013).

Vaughan *et al.* (2006), buscando promotores específicos de raiz com o objetivo de conferir resistência a patógenos de raízes, caracterizaram o promotor *FaRB7* de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.). Este promotor foi inserido em morango e em tabaco com o gene *gus*, onde manteve a expressão específica nos morangos transgênicos, no entanto para o tabaco a expressão foi constitutiva. Este relato mostra que os mecanismos de regulação endógenos das plantas interferem diretamente na atividade do promotor. Os promotores apresentam inúmeros sítios de

ligação para fatores de transcrição específicos; sendo assim, é possível que algumas plantas possuam os fatores de transcrição que se ligarão no promotor inserido e outras plantas não.

A caracterização de promotores órgão/tecido específicos representa, portanto, um tema relevante de pesquisa visando disponibilizar novas ferramentas para a manipulação gênica (WEBER, 2011).

2.4 Fatores de Transcrição

A regulação da expressão gênica é essencial a todos os organismos, pois fornece um mecanismo de controle complexo pelo qual as plantas respondem a estresses abióticos e bióticos e modulam processos de desenvolvimento (AOYAGI, 2013). A maioria dos processos de controle da expressão gênica é realizada no início da transcrição e envolve três elementos: os promotores, (local onde a RNA polimerase e os fatores de transcrição (FT) basais se associam), elementos proximais a promotores que contêm sítios para ligação de fatores de transcrição induzíveis (auxiliam a ligação da RNA polimerase ao promotor) e regiões *enhancer* e *silencers* (aumentam ou reprimem a transcrição) (ALBERTS *et al.*, 2006). Cerca de 3,5 a 5,9% do genoma de plantas e alguns eucariotos são codificadores de fatores reguladores de transcrição (RIECHMANN *et al.*, 2000).

Portanto, os fatores de transcrição constituem elementos importantes que controlam a regulação gênica. São definidos como proteínas que contêm um domínio de ligação que reconhece uma sequência específica de DNA (Figura 2). Assim, os FTs controlam o passo mais importante da regulação gênica, a transcrição, uma vez que este controle assegura que só o necessário seja sintetizado (MITSUDA e TAKAGI, 2009). Os FTs se ligam a sequências específicas presentes na região promotora do gene e/ou pela interação com outros reguladores transcricionais, promovendo o remodelamento da cromatina e modificações de proteínas, visando liberar ou bloquear o acesso da RNA polimerase (enzima responsável pela síntese de mRNA) a determinadas regiões do DNA (UDVARDI *et al.*, 2007; GROTEWOLD, 2008)

Os FTs dos eucariotos são divididos em dois grupos, os fatores gerais de transcrição e os fatores específicos. Os fatores gerais, ou fatores basais, auxiliam na iniciação da transcrição e ajudam no posicionamento da RNA polimerase II no

promotor, na abertura da dupla fita de DNA e na liberação da polimerase para iniciar a extensão do transcrito (AOYAGI, 2013). Assim, os fatores basais são proteínas que se associam a qualquer promotor utilizado pela RNA polimerase e estão presentes em todas as células. Já o segundo grupo dos FTs, é constituído de fatores que distinguem, de forma específica, as sequências reguladoras, sendo capazes de aumentar ou diminuir a frequência com a qual os genes sob o controle destas são expressos (ALBERTS *et al.*, 2006).

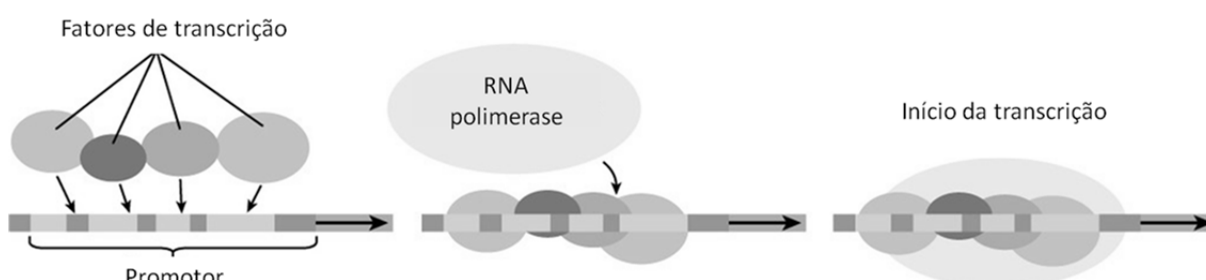


Figura 2. Fatores de transcrição fazendo a regulação do início da transcrição. Fonte: Modificado de Boundless, 2016.

Os FTs possuem uma estrutura modular, que compreende um domínio de ligação ao DNA junto de um domínio regulador (ativador ou repressor), sendo capazes de reconhecer o DNA de uma forma específica e regular a frequência de iniciação da transcrição após a ligação a estes sítios específicos da região promotora dos genes alvos (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001). Este domínio de ligação ao DNA apresenta sequências de aminoácidos típicos, permitindo, com base na similaridade desta sequência, classificar os fatores de transcrição em diferentes famílias (STRACKE; WERBER; WEISSHAAR, 2001).

2.5 A tolerância ao estresse hídrico e o gene *CaHB12*

O estresse é definido como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, o que induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo (LARCHER, 2003). De acordo com Taiz e Zeiger (2004), o estresse é um fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. Os estresses afetam de maneira negativa o crescimento, o metabolismo e a produtividade das plantas. As plantas estão diariamente expostas a diversos tipos de estresses, bióticos e abióticos. Seca, salinidade, baixas e altas temperaturas são os principais

fatores de estresse abióticos que mais limitam a produtividade das culturas (LAWLOR, 2002).

O estresse hídrico se destaca já que é o principal limitante à obtenção de rendimentos mais próximos ao máximo potencial produtivo. A tolerância à falta de água pode ocorrer em maior ou menor intensidade dependendo da espécie, do genótipo, de sua duração e severidade, da idade e estágio de desenvolvimento da planta, do órgão e tipo de célula e do comportamento sub-celular. Assim, as plantas podem apresentar tolerância, quando sobrevivem ao estresse, ou suscetibilidade, quando sofrem redução do crescimento, podendo chegar à morte (CAMBRAIA, 2005).

Quando submetidas a condições de estresse hídrico, as plantas disparam uma complexa cascata de sinalização (dependente ou não do ácido abscísico – ABA) que culmina com a ativação de uma série de mecanismos de resposta responsáveis por conferir tolerância ao estresse (LIMA, 2013). O acúmulo de ácido abscísico sob a percepção da seca serve como um sinal inicial para reações de aclimação de longo prazo, que eventualmente envolvem a expressão diferencial de genes levando a mudanças nos padrões de transcrição (VALDÉS *et al.*, 2013).

A prolina é um aminoácido presente nas proteínas de todos os organismos vivos (CHERIAN *et al.*, 2006). Este aminoácido funciona como um osmólito protetor, protegendo a membrana celular e as proteínas contra os efeitos adversos causados por altas concentrações de íons inorgânicos e temperaturas extremas (SRINIVAS e BALASUBRAMANIAN, 1995). A síntese de prolina está envolvida na geração de ATP para a recuperação e consequente reparo de danos causados pelo estresse (HARE; CRESS; VAN STADEN, 1999). Em plantas do porta-enxerto citrange Carrizo, transformadas com o gene mutante *p5csf129a*, houve acúmulo de altas concentrações de prolina nas folhas e, conseqüentemente, estas apresentaram maior tolerância ao estresse hídrico (MOLINARI *et al.*, 2004). O ajustamento osmótico permite a manutenção do turgor celular e dos processos que dependem deste turgor, tal como, expansão e crescimento celulares, abertura dos estômatos e fotossíntese, além de manter um gradiente de potencial de água favorável à absorção de água pelas raízes das plantas (CHINNUSAMY *et al.*, 2006).

Assim, alguns processos fisiológicos são alterados, como a transpiração, fotossíntese, abertura estomática e ajuste osmótico (BORGES, 2013). Todas as

alterações fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento em plantas têm uma base molecular e genética (CASAGRANDE *et al.*, 2001).

A identificação e a compreensão destes mecanismos de tolerância à seca são cruciais para o desenvolvimento de plantas mais resistentes ao déficit hídrico. Uma resposta fisiológica específica a esse déficit hídrico representa na verdade combinações de eventos moleculares que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (BRAY, 1993). A expressão diferencial de genes ainda não identificados em genótipos tolerantes pode ser usada para o estudo desses mecanismos de tolerância (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997).

O gene *CaHB12* é um fator de transcrição da família homeobox leucina zipper I (HD-Zip-I) e foi identificado em *Coffea arabica*, aparentemente envolvido com a resposta à seca (CRUZ *et al.*, 2007). Já há relatos de que vários genes da família HDZip-I podem estar envolvidos na resposta da planta à seca como os genes de *A. thaliana* *AthB5*, -6, -7 e -12 (HENRIKSSON *et al.*, 2005). Os membros da subfamília I estão envolvidos na resposta adaptativa ao estresse abiótico (ARIEL *et al.*, 2007). A expressão destes genes é regulada, além de seca, por fatores como sal, ABA, etileno, ácido jasmônico, congelamento e outras condições externas e por hormônios em diferentes tecidos e órgãos (LECHNER *et al.*, 2011).

O gene *CaHB12* é homólogo do gene *AtHB12* de *A. thaliana*, o qual regula uma série de genes que codificam proteínas receptoras de ABA (LEE *et al.*, 2001; OLSSON; ENGSTROM; SODERMAN, 2004; VALDÉS *et al.*, 2012). O gene *AtHB12* também foi descrito como envolvido na homeostase iônica de *A. thaliana* (SHIN *et al.*, 2004). Olsson *et al.* (2004) relataram que após estresse osmótico ou hídrico houve um aumento da expressão de *AtHB12* em meristemas, pontas das raízes e flores de *A. thaliana*. Além disso, estes autores mostraram aumento da expressão do gene em plântulas com 14 dias tratadas com ABA ou cloreto de sódio (NaCl) (OLSSON; ENGSTRÖM; SÖDERMAN, 2004). Quando submetidas a estresse osmótico com manitol, as plantas de *A. thaliana* tiveram um aumento de 8 vezes da expressão do *AtHB12* com relação às plantas não estressadas (RÉ *et al.*, 2014). Estes mesmos autores demonstraram um aumento de 30 vezes na expressão de *AtHB12* em plantas que passaram por estresse hídrico moderado. Assim, como há homologia entre o gene *AtHB12* e o gene *CaHB12*, buscou-se, neste trabalho, aprofundar a compreensão sobre a tolerância ao estresse hídrico que este gene causa através da transformação da planta modelo *Populus tremula* x *P. alba*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

AOYAGI, L. N. **Caracterização estrutural e transcricional de fatores de transcrição da família R2R3-MYB no genoma de *Glycine max* em resposta a doenças**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ARIEL, F. D. *et al.* The true story of the HD-Zip family. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 9, p. 419–426, 2007.

BOETTI, H. *et al.* Efficiency of physical (light) or chemical (ABA, tetracycline, CuSO₄ or 2-CBSU)-stimulus-dependent gus gene expression in tobacco cell suspensions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 1, p. 1–13, 1999.

BORGES, J. S. **Análise comparativa do proteoma e metaboloma de raízes de dois clones de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, sendo um tolerante e um susceptível a condições de estresse hídrico**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BOUNDLESS. **Mechanics of Cellular Differentiation**. *Boundless Biology* 2016. Disponível em: <<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/gene-expression-16/regulating-gene-expression-in-cell-development-117/mechanics-of-cellular-differentiation-465-13121/>> Acesso em: 15 mar. 2017.

BRANDALISE, M. *et al.* Caracterização de genes com expressão tecido-específica em raiz e folha de *Coffea arabica*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2005, Londrina. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa Café, 2005.

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

BRASILEIRO, A. C. M. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI; Embrapa-Cenargen, 1998.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.103, p. 1035-1040, 1993.

BUTLER, J. E. F.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, v. 16, n. 20, p. 2583–2592, 2002.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; *et al.* **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

CASAGRANDE, E. C. *et al.* Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v. 13, n. 2, p. 168–184, 2001.

CHEN, L. *et al.* GmPRP2 promoter drives root-preferential expression in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots. **BMC Plant Biology**, v. 14, p. 1–13, 2014.

CHEN, L.; JIANG, B.; WU, C. The characterization of *GmTIP*, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 259–274, 2015.

CHEON, B.Y. *et al.* Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis*. **Transgenic Research**, v. 13, p. 541–549, 2004.

CHERIAN, S. *et al.* Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: Progress and future prospects. **Journal Biologia Plantarum**, v. 50, p. 481–495, 2006.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. *et al.* Salt Stress Signaling and Mechanisms of Plant Salt Tolerance. In: SETLOW, J. K. (Ed.) **Genetic Engineering: Principles and Methods**. Nova York: Springer US, p. 141-177, 2006.

CHIOU, T.; LIU, H.; HARRISON, M. J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. **The Plant Journal**, v. 25, p. 281–293, 2001.

CRUZ, F. P. *et al.* Identificação através de genômica funcional de três genes homeobox envolvidos com a resposta ao estresse hídrico em café a partir de dados do banco genoma café. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2007.

ELMAYAN, T; TEPFER, M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *roID* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S² promoter. **Transgenic Research**, v. 6, p. 388-396, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Marcio Alves Ferreira *et al.* **Use of the coffee homeobox gene *CaHB12* to produce transgenic plants with greater tolerance to water scarcity and salt stress**. WO 061911:A2, 8 Nov. 2011, 18 Maio 2012.

FEI, H. *et al.* Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. **Planta**, v. 216, n. 3, p. 467–474, 2003.

FERRARI, I. F. **Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) em sistemas modelo Micro-Tom (*Solanum luxopersicum L.*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

FILICHKIN, S. A. *et al.* Enhancer trapping in woody plants: Isolation of the ET304 gene encoding a putative AT-hook motif transcription factor and characterization of the expression patterns conferred by its promoter in transgenic *Populus* and *Arabidopsis*. **Plant Science**, v. 171, n. 2, p. 206–216, 2006.

FILLATTI, J.J. *et al.* Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of *Populus*. **Molecular and General Genetics**, v.206, p.192-199, 1987.

FOSTER, G. D.; TAYLOR, S. **Plant Virology Protocols**. Reino Unido: Humana Press, 1998.

FRAISIER, V. *et al.* Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana glauca*: Evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 489–496, 2000.

GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.138–144, 2008.

GRUNENVALDT, R. L. **Clonagem de promotores raiz-específicos de *Eucalyptus grandis* e validação em *Nicotiana tabacum***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

GUSEMAN, J. M. *et al.* *DRO1* influences root system architecture in *Arabidopsis* and *Prunus* species. **The Plant Journal**, v. 89, p. 1093-1105, 2016.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p 413–434, 1999.

HENRIKSSON, E. *et al.* Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. **Plant physiology**, v. 139, n. 1, p. 509–518, 2005.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119, 2014.

HUANG, L. *et al.* Identification and validation of root-specific promoters in rice. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO journal**, v. 6, n. 13, p. 3901–7, 1987.

JEONG, J.S. *et al.* Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. **Plant Physiology**, v. 153, p. 185–197, 2010.

JONES, M. O. *et al.* The promoter from SIREO, a highly-expressed, root-specific *Solanum lycopersicum* gene, directs expression to cortex of mature roots. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 12, p. 1224–1233, 2008.

KUREK, I. *et al.* Overexpression of the wheat FK506-binding protein 73 (FKBP73) and the heat-induced wheat FKBP77 in transgenic wheat reveals different functions of the two isoforms. **Transgenic Research**, v. 11, p. 373–379, 2002.

LARCHER W. **Physiological plant ecology**. Springer, Verlag; 2003.

LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871–885, 2002.

LEACH, F.; AOYAGI, K. Promoter analysis of the highly expressed rolC and rolD root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated. **Plant Science**, v. 79, n. 1, p. 69–76, 1991.

LECHNER, E., *et al.* MATH/BTB CRL3 receptors target the homeodomain-leucine zipper ATHB6 to modulate abscisic acid signaling. **Developmental Cell**, v. 21, p. 1116–1128, 2011.

LEE, Y. H. *et al.* Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene Athb-12. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 1, p. 133–141, 2001.

LEE, Y. H.; CHUN, J. Y. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. **Plant Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 377–384, 1998.

LI, Y. *et al.* Isolation and characterization of two novel root-specific promoters in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Science**, v. 207, p. 37–44, 2013.

LIMA, L. T. I. **Influência de dois vetores na genética de um híbrido comercial urograndis via *Agrobacterium rhizogenes***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 52, n. 1, p. 103–120, 2003.

LU, H.; ZHAO, Y. L.; JIANG, X. N. Stable and specific expression of 4-coumarate:coenzyme a ligase gene (4CL1) driven by the xylem-specific Pto4CL1 promoter in the transgenic tobacco. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 14, p. 1147–1152, 2004.

LV, D.; ZHANG, Y. Isolation and functional analysis of apple MdHMGR1 and MdHMGR4 gene promoters in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.7, p. 1–11, 2016.

MAIZEL, A.; WEIGEL, D. Temporally and spatially controlled induction of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 38, p. 164–171, 2004.

MEINKE, D. W. *et al.* *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **Science**, v. 282, n. 5389, p. 662–682, 1998.

MITSUDA, N.; TAKAGI, M.O. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n.7, p.1232–1248, 2009.

MOLINARI, H. B. C. *et al.* Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p.1375-1381, 2004.

NITZ, I. *et al.* Pyk 10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 161, p. 337–346, 2001.

OHLEER, U.; NIEMANN, H. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches. **Trends in Genetics**, v.17, n.2, p.56- 60, 2001.

OLSSON, A. S. B.; ENGSTRÖM, P.; SÖDERMAN, E. The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 663–677, 2004.

PEREIRA, W. E. L. **Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

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

PREISZNER, J. *et al.* Structure and activity of a soybean *Adh* promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 8, p. 763-769, 2001.

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

RÉ, D. *et al.* *Arabidopsis AtHB7* and *AtHB12* evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 150, 2014.

RIECHMANN, J. L. *et al.* *Arabidopsis* Transcription Factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. **Science**, v. 290, p. 2105-2109, 2000.

RODRIGUES, M. I. *et al.* The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of *Eucalyptus grandis*: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. **Plant Science**, v. 213, p. 106–113, 2013.

SANTANA, R. H. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos de plantas de soja (*Glycine max*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SASSAKI, F. T. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos a partir de informações do banco forests (*Eucalyptus* genome sequencing project consortium)**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

SEVERINO, F.E. *et al.* *CaPrx*, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. **Plant Science**, v. 192, p. 35–42, 2012.

SHEN, J. *et al.* The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. **Scientific Reports**, v.12, p. 1–14, 2017.

SHIN, D. *et al.* Athb-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from *Arabidopsis thaliana*, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 534–540, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327-334, 1997.

SIERRO, N. *et al.* The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v.5, p. 1- 9, 2014.

SRINIVAS, V.; BALASUBRAMANIAN, D. Proline is a protein-compatible hydrotrope. **Langmuir**, v. 11, p. 2830-2833, 1995.

STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 447–456, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ARTMED. p.75-93, 2004.

TAYLOR, G. *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? **Annals of Botany**, v. 90, n. 6, p. 681–689, 2002.

UDVARDI, M. K. *et al.* Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v.144, p. 538-549, 2007.

VALDÉS, A.E. *et al.* Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v.79, p. 263– 276, 2013.

VAUGHAN, S. P. *et al.* Characterization of *FaRB7*, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3901–3910, 2006.

VIJAYBHASKAR, V. *et al.* Identification of a root-specific glycosyl transferase from *Arabidopsis* and characterization of its promoter. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 185–193, 2008.

WEBER, R. L. M. **Ferramentas biotecnológicas com potencial aplicação na obtenção de plantas transgênicas de soja com maior resistência a estresses abióticos e bióticos.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WEI, H. *et al.* Nitrogen deprivation promotes *Populus* root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks. **New Phytologist**, v. 200, p. 483–497, 2013.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: Ed. da UFV, 2013.

XIAO, K *et al.* Isolation and Characterization of Root-Specific Phosphate Transporter Promoters from *Medicago truncatula*. **Plant Biology** v. 8, p. 439–449, 2006.

XU, R. *et al.* The 73 kD subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex affects reproductive development in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 61, p. 799–815, 2006.

YAMAMOTO, Y. T. *et al.* Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. **The Plant Cell**, v. 3, n. 4, p. 371–82 , 1991.

CAPITULO 1

3 VALIDAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *G02172* DE *Eucalyptus grandis* EM *Nicotiana tabacum*

RESUMO

O uso de promotores com expressão tecido-específica é uma alternativa viável para a substituição dos promotores com expressão constitutiva, geralmente utilizados em transgenia. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas com o promotor *G02172* isolado de *Eucalyptus grandis*, onde apresenta expressão específica em raiz. Para isso, utilizou-se plantas de tabaco transformadas com o plasmídeo pCAMBIA 1303 com promotor *G02172* dirigindo o gene marcador *gus*, o gene marcador *gfp* e o gene de seleção *HygR*, renomeado para pCAMBIA 1303 B21. Inicialmente, realizou-se uma PCR para analisar as plantas crescidas na presença de higromicina. Após a eletroforese dos produtos da PCR, esta foi positiva para o gene *gus* e para o promotor *G02172* em 10 eventos e em um evento com o promotor *CaMV35S*, utilizado, neste caso, como um controle positivo. Em seguida, foi realizado o teste histoquímico e de quantificação da atividade da enzima β -glucuronidase. A atividade da enzima não foi específica nas raízes do tabaco, porém houve maior expressão do gene *gus* nas raízes e nos caules, quando comparados a folhas. As plantas foram aclimatizadas e suas sementes coletadas. Não houve modificações morfológicas nas plantas transformadas. As sementes foram germinadas na presença de higromicina para verificação da transferência do gene de resistência a geração T1. Foi extraído o DNA das plântulas que cresceram na presença de higromicina as quais foram analisadas via PCR, o qual foi positivo para o promotor. Portanto, o promotor *G02172* foi considerado preferencialmente expresso em raízes e caules em *Nicotiana tabacum*.

Palavras-chave: Família Beta V 1; promotor tecido específico; gene *gus*.

CHAPTER 1

3 VALIDATION OF A ROOT-SPECIFIC PROMOTER OF *Eucalyptus grandis* IN *Nicotiana tabacum*

ABSTRACT

The use of promoters with tissue-specific expression is a viable alternative for the substitution of constitutive expression promoters, generally used in transgenic plants. In this context, the present study aimed to evaluate *Nicotiana tabacum* plants transformed with the *G02172* promoter isolated from *Eucalyptus grandis*, where it presents a root-specific expression. For this, tobacco plants were transformed with a pCAMBIA 1303 plasmid carrying *G02172* promoter directing the *gus* marker gene, the *gfp* marker gene and the HygR selection gene, renamed pCAMBIA 1303 B21. Initially, a PCR was performed to analyze the plants grown in the presence of hygromycin. The electrophoresis of the PCR products was positive for the *gus* gene and for the *G02172* promoter in 10 events and in an event with the *CaMV35S* promoter, used, in this case, as a positive control. Then, the histochemical test and quantification of β -glucuronidase enzyme activity were performed. The activity of the enzyme was not specific in the roots of the tobacco, but there was a greater expression of the *gus* gene in the roots and stems, when compared to leaves. The plants were acclimatized and their seeds collected. There were no morphological changes in the transformed plants. Seeds were germinated in the presence of hygromycin and the transfer of resistance gene to T1 generation was verified. DNA was extracted from seedlings grown in the presence of hygromycin which were analyzed via PCR, which was positive for the promoter. Therefore, the *G02172* promoter was considered preferentially expressed in roots and stems in *Nicotiana tabacum*.

Keywords: Beta V 1 family; specific-tissue promoter; gene *gus*.

3.1 INTRODUÇÃO

A transformação genética é uma técnica usada mundialmente para a introdução de um transgene em uma planta de interesse. Para tanto, é necessária uma construção gênica complexa, onde será inserido o gene de interesse, com a possibilidade de carregar também gene marcador e/ou de seleção, além de seus respectivos promotores. Embora o transgene seja claramente importante, um promotor adequado desempenha um papel chave no controle da expressão transgênica (espacial e temporalmente) (DE LA TORRE *et al.*, 2014).

Os promotores podem ser classificados em constitutivos, induzíveis e órgão e/ou tecido-específicos. Os promotores considerados constitutivos são aqueles que promovem a expressão do gene em todos os tecidos e durante toda a vida da planta. Os promotores induzíveis induzem a expressão do gene na presença ou na ausência de estímulos físicos ou químicos. Já os promotores órgãos ou tecidos específicos promovem a expressão do gene em somente um órgão ou tecido e não em toda a planta.

O promotor constitutivo mais frequentemente usado em estudos de transformação é o *CaMV35S* (35S do Vírus do Mosaico da Couve Flor). Entretanto, vários autores recomendam o uso de promotores específicos e não de promotores constitutivos para evitar efeitos colaterais indesejáveis e obter maior eficiência (DE LA TORRE *et al.*, 2014).

O promotor utilizado neste trabalho é o *G02172*, o qual promove a expressão do gene *Eucgr.G02172*. Este gene foi isolado em raízes de *Eucalyptus grandis* com dois anos (GRUNENVALDT, 2014). Em pesquisas anteriores, a expressão deste gene não foi identificada em xilema imaturo, folhas maduras, floema, xilema e em folhas jovens, somente em raízes de eucalipto. Além disso, sabe-se que o gene *Eucgr.G02172* possui um domínio proteico característico da família Beta V I, relacionado a patogêneses.

Nicotiana tabacum é uma conhecida planta modelo de fácil regeneração e transformação. Além dessas características, o tabaco possui um ciclo de vida curto e produz grande quantidade de sementes. Tendo em vista estas qualidades, o tabaco foi escolhido para a validação do promotor em estudo.

Assim, tomando como base essas pesquisas, foram avaliadas plantas transgênicas de tabaco transformadas com o promotor *G02172* dirigindo a expressão do gene *gus* a fim de validar sua expressão em raíz.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e no Laboratório de Biologia Molecular (CQB 302/10) pertencentes a Embrapa Florestas – CNPF, localizada em Colombo, Paraná, e na Casa de Vegetação (CQB 114/99) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada em Curitiba, Paraná.

3.2.1 Transformação de *Nicotiana tabacum* com o promotor *G02172*

Neste trabalho foram utilizados 10 eventos de *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 transformados com o promotor *G02172* e um evento transformado com o promotor *CaMV35S* (vírus do Mosaico da Couve-Flor) obtidos por Grunennvaldt (2014) e mantidos *in vitro*. Estas plantas foram transformadas por essa autora mediante co-cultura com *Agrobacterium tumefaciens*, cepa EHA105, carregando o plasmídeo pCAMBIA1303 B21 (Figura 3) que contém o gene de seleção *HygR* conferindo resistência a higromicina, o gene *gus* e o gene *gfp* (GRUNENNVALDT, 2014).

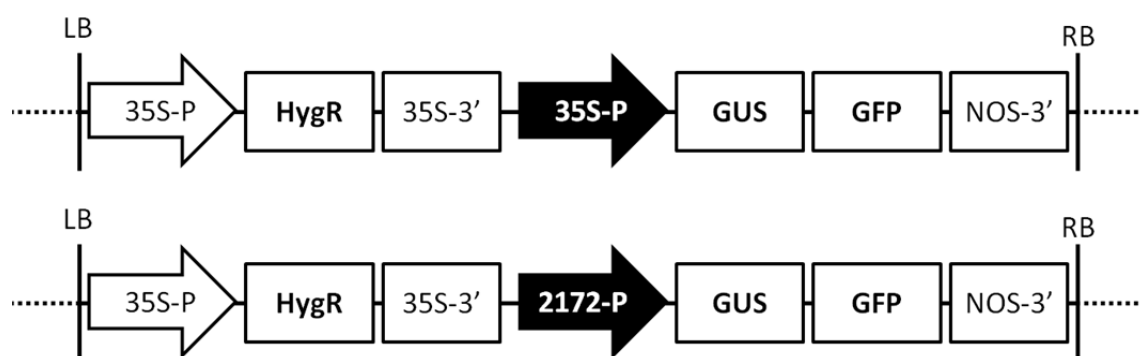


Figura 3 - T-DNA do plasmídeo pCAMBIA1303 B21 utilizado na transformação genética de *Nicotiana tabacum* (GRUNENNVALDT, 2014). LB: Borda esquerda do T-DNA; 35S-P: Promotor *CaMV35S* (vírus do Mosaico da Couve-Flor); *HygR*: gene que confere resistência ao antibiótico higromicina; 35S-3': Terminador do *CaMV35S*; 2172-P: Promotor *G02172*; GUS: gene repórter que codifica a enzima β -glucuronidase; GFP: gene repórter que codifica a proteína verde fluorescente; NOS-3': Terminador da nopalina sintetase; RB: Borda direita do T-DNA.

3.2.2 Material vegetal e condições gerais de cultura

A cada 30 dias, os brotos de *Nicotiana tabacum* resistentes ao antibiótico higromicina obtidos por Grunennvaldt (2014) foram subcultivados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar (Meio de Multiplicação).

As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 mmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 23± 2°C, em frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 40 mL de meio de cultura.

3.2.3 Extração de DNA e análise de integração do transgene

Foram coletadas as folhas dos 10 eventos, do controle negativo (tabaco não transformado) e do controle positivo (tabaco transformado com o gene *gus* sob controle do promotor *CaMV35S*) após 4 meses de cultivo em meio de multiplicação. A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987).

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do promotor *G02172* e do gene *gus*. Para as reações de amplificação foram utilizados: 0,5 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton[®] X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl₂ (50 mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada) e 1 µL de Taq polimerase, para um volume final de 25 µL. Foram utilizados *primers* específicos para o promotor *G02172* (F: 5' GAATTCGCCTGACAACCGATGAGCCACCTA 3' e R: 5' AGATCTACCATTCCCCCCTTTTTTCTGAGTGATAATTGTG 3') e para o gene *gus* (F: 5' CAGCGCGAAGTCTTTATACCG 3' e R: 5' ATGCGTCACCACGGTGATATCG 3').

As reações foram amplificadas em termociclador com as seguintes programações: pré-ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e ciclo final de 72°C por 7 minutos para o promotor

G02172; para o gene *gus* foi realizado pré-ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,1% de brometo de etídio e visualizados em transluminador, de maneira a avaliar a amplificação dos fragmentos.

3.2.4 Avaliação da expressão do gene *gus* pelo teste histoquímico

A avaliação da expressão do gene *gus* foi realizada por meio da reação histoquímica catalisada pela enzima β -glucuronidase na presença do tampão X-gluc (JEFFERSON *et al.*, 1987). Após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio de multiplicação, as plantas foram imersas na solução tampão composta por 10 mM de Na₂EDTA.H₂O, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de NaH₂PO₄, 0,5 mM de K₄Fe(CN)₆ e 50 mg mL⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo e incubados a 37°C por 18 h. Em seguida, as plantas foram lavadas com etanol 70% para total eliminação da clorofila.

A determinação da expressão do gene *gus* foi visual e considerou-se como *gus* positivo o tecido que apresentou uma ou mais regiões com a coloração azul.

3.2.5 Determinação quantitativa da atividade da enzima β -glucuronidase (GUS)

Para quantificar a enzima GUS foi realizado um ensaio fluorimétrico de acordo com Jefferson *et al.* (1987) onde 100 mg de raiz, folhas ou caule de cada evento, além do controle negativo, foram macerados em 500 μ L de tampão de extração (50 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,0; 2 mL de EDTA 500 mM, pH 8,0; 330 μ L de Sarcosil 30%; 100 μ L de Triton® X-100; 70 μ L de β -mercaptoetanol; q.s.p 100 mL de água) contendo 1 mM 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronídeo (MUG). Em seguida, os extratos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e foram adicionados 150 μ L do tampão de reação (22 mg de MUG em 25 mL de tampão de extração). Os tubos foram incubados a 37 °C por 10 min. Após este período, foi adicionado 50 μ L de cada extrato no tampão de reação. Após 15 minutos, foi retirada uma alíquota de 20 μ L da mistura e adicionado em 1,98 mL de tampão de parada (21,2 g de Na₂CO₃ em q.s.p. 1L de água destilada autoclava) e,

em seguida, a fluorescência das amostras foi medida com uma excitação de 365 nm, emissão de 455 nm em espectrofluorímetro (RF-5301PC Shimadzu®).

Cada evento foi analisado isoladamente, a fim de definir qual parte da planta (folha, caule ou raiz) obteve maior atividade da enzima GUS. Foram utilizadas partes de três plantas. A leitura no espectrofluorímetro foi realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em nmol de MU/mg de proteína/min. Foram quantificadas as proteínas totais de cada parte da planta. A extração e quantificação das proteínas foram baseadas no método desenvolvido por Bradford (1976).

Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variâncias, em seguida foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2009).

3.2.6 Aclimatização

Os brotos dos eventos e do controle obtidos *in vitro* foram enraizados em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. As plantas foram pré-aclimatizadas em sala de crescimento por um período de 48 horas. A pré-aclimatização consistiu no afrouxamento da tampa dos frascos de cultura e na adição de 10 mL de água destilada (CAUDURO, 2013). As raízes foram então lavadas para retirada do meio de cultura e as plantas transferidas para vasos plásticos contendo solo e vermiculita (1:1).

Cinco plantas de cada um dos 11 eventos (10 eventos com o promotor *G02172* e 1 com o promotor *CaMV35S*) e do controle negativo foram aclimatizadas e mantidas em casa de vegetação para posterior avaliação morfológica e coleta das sementes.

3.2.7 Análises morfológicas

As plantas aclimatizadas foram avaliadas aos 60 dias para as seguintes variáveis morfológicas: número de folhas do terço médio das plantas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm), tamanho dos entrenós, número de flores e de botões e altura da planta (cm).

Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variâncias, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional ASSISTAT[®] (SILVA e AZEVEDO, 2009).

Após a frutificação e maturação das cápsulas, as sementes foram coletadas para posterior análise.

3.2.8 Germinação das sementes T1 na presença de higromicina

As sementes T1 dos 11 eventos (10 eventos com o promotor *G02172* e 1 com o promotor *CaMV35S*) e do controle negativo foram desinfestadas no fluxo laminar com hipoclorito de sódio 10% por 20 min seguido de álcool 70% por 1 min e três lavagens com água destilada autoclava. Em seguida, foram semeadas em meio MS contendo 40 mg L⁻¹ de higromicina. As placas foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 23 \pm 2°C, sendo a germinação avaliada após 30 dias da semeadura. Cada repetição foi composta por uma placa contendo 15 sementes, totalizando 10 repetições por evento, mais o controle.

Quando as plântulas germinadas atingiram 2 cm, foram transferidas para frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 40 mL de meio de multiplicação e mantidas na sala de crescimento para posterior análise. A cada 30 dias, as plantas foram subcultivadas no mesmo meio de cultura.

Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variâncias, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional ASSISTAT[®] (SILVA e AZEVEDO, 2009).

3.2.9 Extração de DNA e análise de integração do transgene da geração T1

Foram coletadas folhas de quatro plântulas germinadas em higromicina a fim de se verificar a inserção do promotor *G02172* no genoma da geração T1. A extração do DNA foi realizada pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987).

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do promotor *G02172*. Para as reações de amplificação foram utilizados: 0,5 µg/µL de DNA; 2,5 µL de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 µL MgCl₂ (50 mM); 2,5 µL de dNTPs (10 mM); 1 µL de cada *primer forward* e *reverse* (10 µM cada) e 1 µL de Taq polimerase, para um volume final de 25 µL. Foram utilizados primers específicos para o promotor *G02172* (F: 5' GAATTCCGCCTGACAACCGATGAGCCACCTA 3' e R: 5' AGATCTACCATTCCCCCCTTTTTTCTGAGTGATAATTGTG 3').

As reações foram amplificadas em termociclador com as seguintes programações: pré-ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e ciclo final de 72°C por 7 minutos para o promotor *G02172*.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,1% de brometo de etídio e visualizados em transluminador, de maneira a avaliar a amplificação dos fragmentos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o intuito de caracterizar funcionalmente o promotor de um gene de eucalipto com expressão específica em raiz, este foi clonado e fusionado ao gene *gus* (que codifica a β -glucuronidase) e inserido em plantas de tabaco (GRUNENVALDT, 2014). A comprovação da inserção do gene *gus* e do promotor *G02172* foi feita através da técnica de PCR. Foram obtidos 10 eventos transformados com o promotor *G02172* e um evento transformado com o promotor *CaMV35S* (Figura 4). Como controle positivo utilizou-se o DNA plasmidial contendo o plasmídeo pCAMBIA 1303 com o promotor *G02172* e como controle negativo, utilizou-se o DNA de um tabaco não transformado. Como pode ser observado na Figura 4, houve a amplificação de um fragmento correspondente ao promotor *G02172*, com 1kb de pares de base (Figura 4-A) e de um fragmento correspondente ao gene *gus*, com 400pb (Figura 4-B).

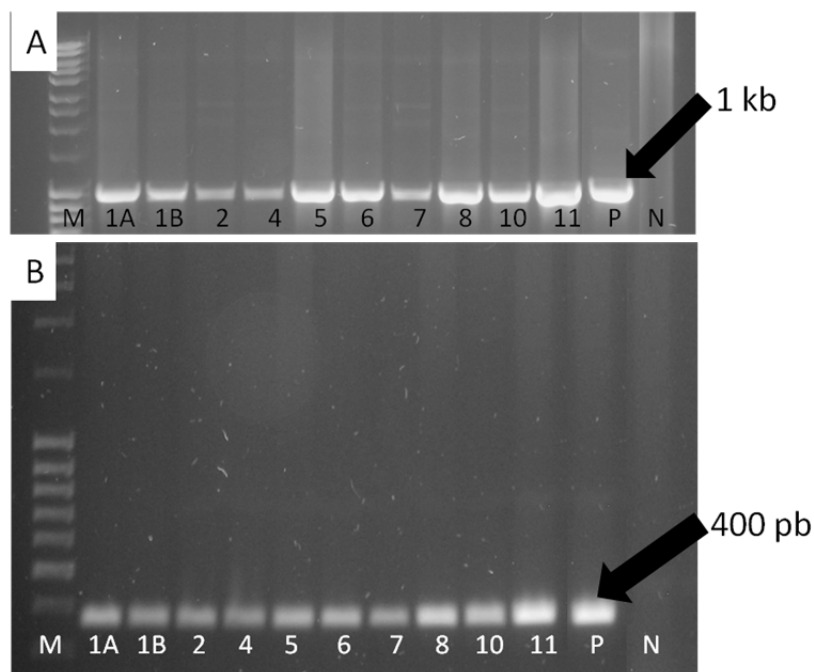


Figura 4: Eletroforese dos produtos de PCR realizados com o DNA de *Nicotiana tabacum* com os primers do promotor *G02172* (A) e do gene *gus* (B). M: Marcador de peso molecular com 10 kb MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 1A – 11: Eventos confirmados. P: Controle positivo; N: Controle negativo. Os produtos esperados de 1 kb (promotor *G02172*) e de 400 pb (*gus*) foram observados em todas as amostras analisadas (com exceção do tabaco não transformado).

Os eventos positivos após a PCR foram submetidos ao ensaio histoquímico de GUS para averiguar se a expressão do gene *gus* estava ocorrendo apenas nas raízes. Na Figura 5 é possível observar, em todos os eventos, a presença de coloração azul relativa à reação da enzima β -glucuronidase com o substrato X-Gluc. Como controle positivo, utilizou-se evento transformado com o promotor *CaMV35S*, o qual apresentou a expressão constitutiva, como esperado (Figura 5-L). Como controle negativo foi utilizada uma planta de tabaco não transformada, a qual não apresentou a coloração azul (Figura 5-M). Esses resultados comprovam que o fragmento do promotor utilizado é funcional e dotado de atividade transcricional, no entanto, não apresenta especificidade em raízes de tabaco (Figura 5).

Como pode ser visto na Figura 5, cada evento apresentou uma expressão diferente e não houve especificidade na expressão. Nossos resultados corroboram os de Santana (2012) que afirmou que a expressão do transgene não é uniforme em todas as plantas geradas sob as mesmas condições, pois ela está sujeita a vários mecanismos de regulação endógena da planta. É possível que a inserção do promotor *G02172* fusionado ao gene *gus* em diferentes locais do genoma de cada evento tenha proporcionado a diferença na atividade da enzima GUS.

Rodrigues *et al.* (2013) obtiveram resultados parecidos quando estudaram o gene *EgTIP2*, também isolado de *E. grandis*. O gene *EgTIP2* foi expresso somente nas raízes de *E. grandis*; no entanto, quando o promotor deste gene foi fusionado com o gene *gus* e inserido em tabaco, a expressão se mostrou constitutiva. O promotor *5B* isolado de *E. grandis* por Ribeiro (2009) apresentou o mesmo padrão do promotor *G02172*, com especificidade em raízes e, quando inserido em tabaco, a expressão foi em folhas e raízes das plantas transgênicas (COSTA, 2011).

Em outras espécies este fato também aconteceu, como no caso do promotor *FaRB7* isolado de morango e inserido em plantas de morango e em tabaco. Nas plantas de morango, o promotor manteve a expressão específica enquanto que no tabaco a expressão foi constitutiva (VAUGHAN *et al.*, 2006). Além desses autores citados, outros obtiveram resultados parecidos quando utilizaram promotores raiz-específicos em hospedeiros heterólogos (SHIRSAT *et al.*, 1991; VAN DER HOEVEN *et al.*, 1994; GITTINS *et al.*, 2001).

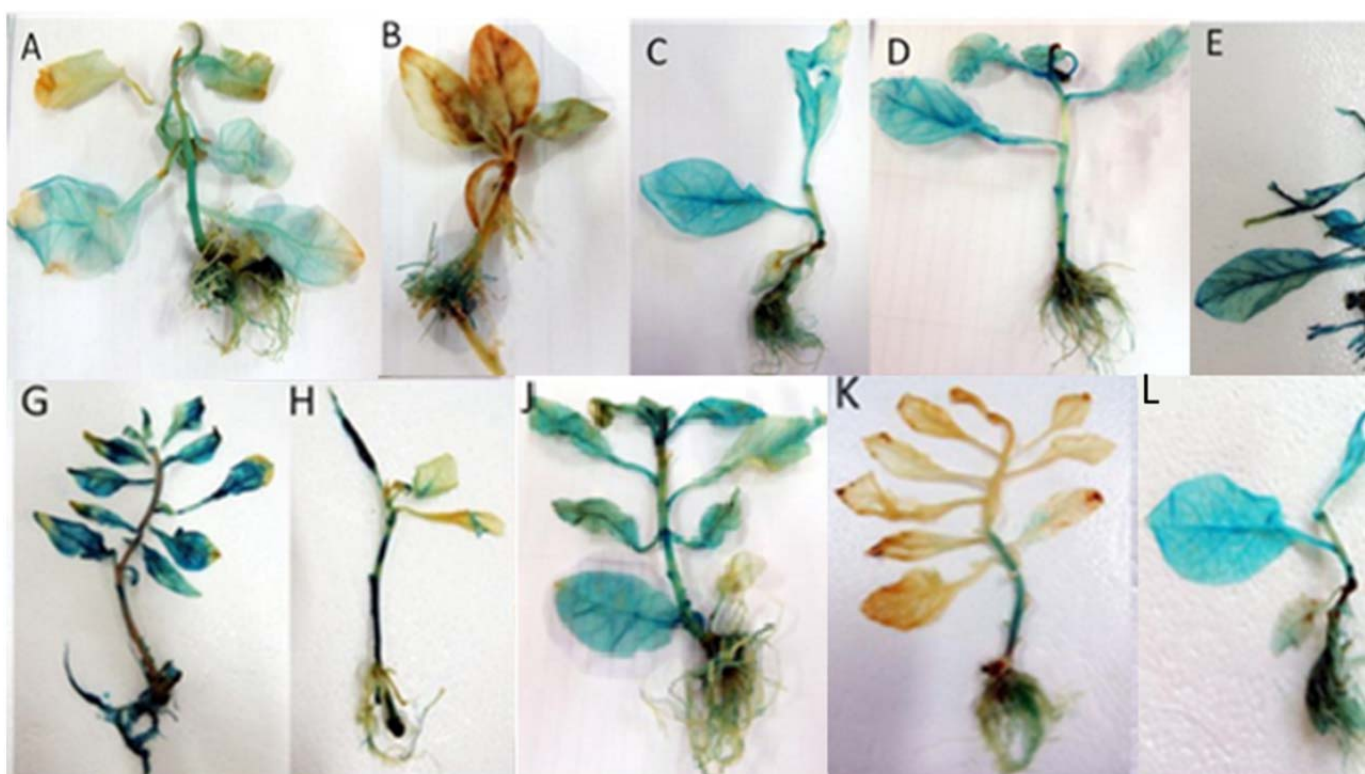


Figura 5 – Eventos de *Nicotiana tabacum* transformados com o promotor *G02172* (A-K) e com o promotor *CaMV35S* (L), ambos dirigindo o gene *gus*. M: Tabaco não transformado (controle negativo). Barra = 5 cm.

Van der Hoeven *et al.* (1994) fusionaram o promotor *par*, isolado de *Parasponia andersonii*, com o gene *gus* e inseriram em *N. tabacum*. Este promotor foi específico nas raízes de *P. andersonii*, no entanto, em tabaco apresentou expressão em folhas e raízes. Gittins *et al.* (2001) isolaram o promotor 940ext do gene extensina A de *Brassica napus*, o qual é altamente expresso apenas nas raízes dessa planta. No entanto, quando este promotor foi fusionado ao gene *gus* e inserido em macieira (*Malus pumila* Mill cv. Greensleeves) a expressão foi maior no caule e não houve expressão nas raízes. Estes autores concluíram que a sequência usada (940 pb) não tinha os elementos que proporcionam a expressão específica nas raízes de *Brassica*. O mesmo pode ter acontecido com o promotor *G02172* que possui 1000 pb e pode não conter os elementos do promotor que conduziram à expressão específica em raízes do tabaco.

Para avaliar a expressão em cada órgão das plantas transformadas, foi quantificada a atividade da enzima β -glucuronidase produzida pelo gene *gus*. Cada evento apresentou um padrão de expressão diferente, sendo que em alguns houve maior expressão no caule e em outros maior expressão nas raízes. Os eventos

1A,1B, 2 e 7 apresentaram maior atividade da enzima em raízes e os valores diferiram estatisticamente quando comparados com os das folhas e caule (Figura 6). Para os eventos 4, 5, 10 e 11 a atividade foi maior nos caules do que nas raízes e nas folhas, diferindo estatisticamente. Assim, o promotor *G02172* pode ser considerado preferencialmente expresso em raízes e caules em *N. tabacum*.

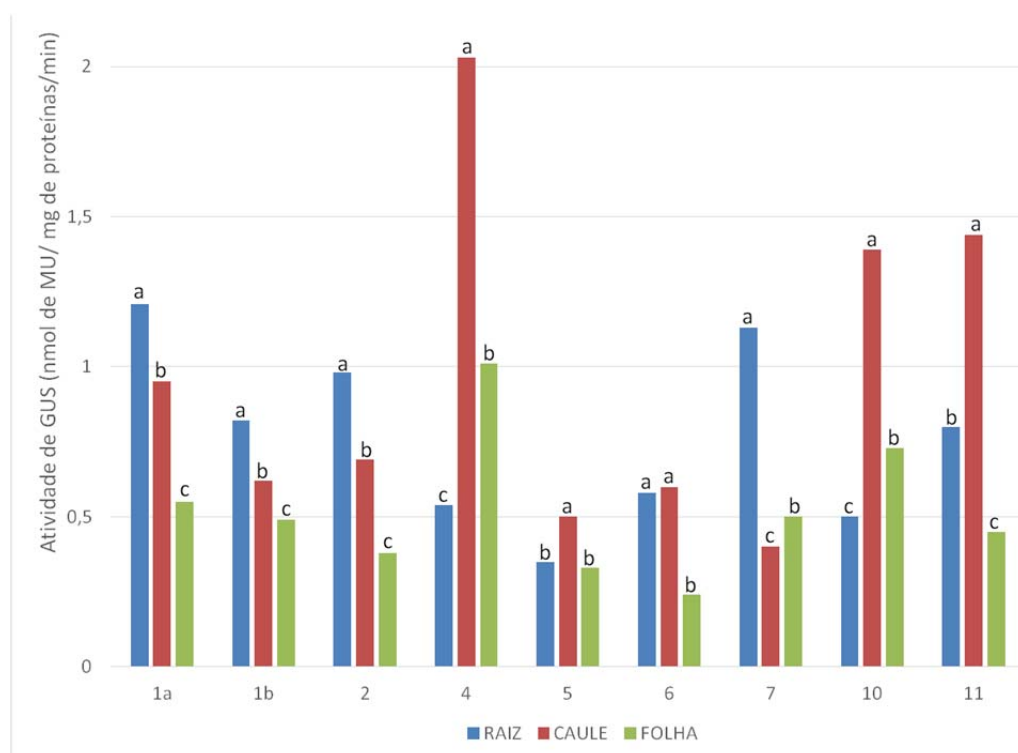


Figura 6. Atividade da enzima GUS nas raízes, caule e folhas dos eventos de *Nicotiana tabacum* transformados com o gene *gus* sob controle do promotor *G02172* (1A,1B, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11) e do promotor *CaMV35S*. Letras diferem entre si em cada evento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A inexistência de elementos CIS que podem estar presentes somente no *Eucalyptus grandis*, espécie onde o promotor *G02172* foi identificado, e não no tabaco, também seria uma hipótese para a expressão constitutiva desse promotor. A regulação espaço-temporal da expressão de um gene requer a ligação dos fatores de transcrição em sequências que estão localizadas na região proximal ou a certa distância do promotor core (WEINZIERL, 1999).

Outras explicações para essa expressão nos tabacos transformados seria o tamanho do promotor clonado bem como a ausência no tabaco de elementos regulatórios que seriam necessários para regular a expressão tecido-específica, tais como os *enhancers* e outros elementos distais (COSTA, 2011). A ausência dos

enhancers pode determinar um padrão de expressão inesperado. Um *enhancer* pode exercer sua função em locais próximos ou a longas distâncias do gene a ser regulado (SINGER *et al.*, 2011). West e Fraser (2005) afirmaram que os *enhancers* podem estar localizados a mais de 10 kb de distância do gene alvo. Portanto, se, no caso do promotor *G02172*, *enhancers* que promovem a especificidade na raiz do eucalipto estiverem longe da região promotora, pode-se ter perdido tal regulação, causando a não especificidade nos tabacos transformados.

A transcrição pela RNA polimerase II requer fatores gerais de transcrição associados ao promotor e, assim, se ao utilizar as enzimas de restrição para a clivagem do promotor, perdeu-se os nucleotídeos que seriam responsáveis pela ligação destes fatores de transcrição, perde-se também a especificidade do promotor. O promotor *G02172* clonado apresenta 1000 pb, mas podem-se ter perdido elementos necessários para a especificidade em raiz ou a ausência dos elementos regulatórios, como já dito anteriormente. Além disso, o número de cópias do transgene e a posição no genoma pode influenciar a atividade do promotor (VAUGHAN *et al.*, 2006).

Outro fator que ainda precisa ser estudado é a indução da expressão específica em raízes por estresse, já que o promotor *G02172* apresenta um domínio proteico característico de proteínas que respondem a estresses, pertencentes à família de proteínas relacionadas a patógenos Beta V 1 (*Pathogenesis-related protein Bet v I family*) (RADAUER *et al.*, 2008). As proteínas dessa família tem sua expressão induzida em situações de infecção por patógenos, ferimentos e estresses abióticos (KITAJIMA e SATO, 1999).

A fim de verificar se houve diferenças morfológicas causadas pela presença do promotor *G02172* e pela expressão do gene *gus*, foi realizada a análise morfológica dos eventos aclimatizados (Tabela 1). Não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados, mostrando, assim, que a morfologia das plantas de tabaco transgênicas não é diferente dos controles (Anexo 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) Portanto, apesar do promotor *G02172* apresentar uma expressão constitutiva, ele não causou problemas morfológicos nos tabacos.

Tabela 1. Morfologia de *Nicotiana tabacum* não transformado (controle), transformados com o promotor G02172 (1A, 1B, 2, 4, 5, 6, 7, 10 e 11) e transformado com o promotor CaMV35S após 60 dias da aclimatização. Valores das médias das quatro repetições.

Evento	Nº folhas por planta*	Comprimento folhas (cm)*	Largura folhas (cm)*	Nº entrenós*	Nº flores*	Nº botões*	Altura (cm)*
Controle	4,00	10,40	4,12	1,64	3,0	1,5	39,5
1A	3,80	9,01	3,37	1,30	2,0	1,0	27,2
1B	4,75	10,10	3,16	1,25	1,0	1,0	24,0
2	3,00	9,00	2,66	1,25	3,0	2,2	23,0
4	4,20	9,95	3,13	1,81	1,2	0,8	27,2
5	4,40	10,80	3,74	1,90	3,2	0,4	32,4
6	4,00	9,85	4,69	1,80	2,4	1,4	28,0
7	4,60	9,44	4,12	1,50	3,0	0,4	28,0
10	4,20	9,78	3,55	1,90	1,8	1,6	31,8
11	6,00	11,20	4,25	1,33	2,0	4,0	44,0
35S	6,00	10,58	5,06	1,76	4,0	0,0	29,0
CV%	25,26	27,09	28,02	42,98	13,03	38,22	37,20

*: Não significativo pelo teste F.

As sementes dos eventos aclimatizados foram coletadas assim que as cápsulas amadureceram e foram germinadas na presença de higromicina. Como esperado, as plântulas do controle não transformado não germinaram no meio com o antibiótico, enquanto que as sementes oriundas dos eventos transformados germinaram entre 34,00 a 60,95% (Tabela 2 – Anexo 8). Assim, pode-se confirmar a presença estável do gene de resistência a higromicina na geração seguinte às plantas transformadas.

Tabela 2. Germinação *in vitro* das sementes de *Nicotiana tabacum* não transformado (controle), transformado com o promotor *G02172* e transformado com o promotor *CaMV35S* cultivados em meio de cultura MS com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 40 mg L⁻¹ de higromicina, avaliadas após 30 dias.

Evento	% Germinação
Controle	0,00 d
1A	58,00 a
1B	51,30 b
2	34,00 c
4	41,90 b
5	67,33 a
6	58,09 a
7	60,95 b
10	44,76 c
11	42,85 c
35s	40,00 c
CV%	30,54

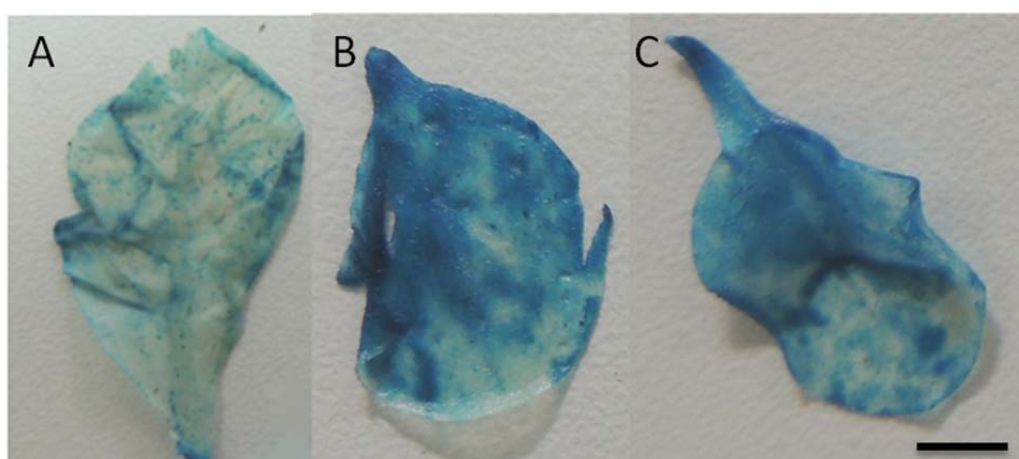


Figura 7. Teste histoquímico de GUS nas folhas da geração T1 de *Nicotiana tabacum* transformado com promotor *G02172* fusionado ao gene *gus* cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 40 mg

L⁻¹ de higromicina. A: T1 do evento 2; B: T1 do evento 4; C: T1 do evento 7. Barra = 1 cm.

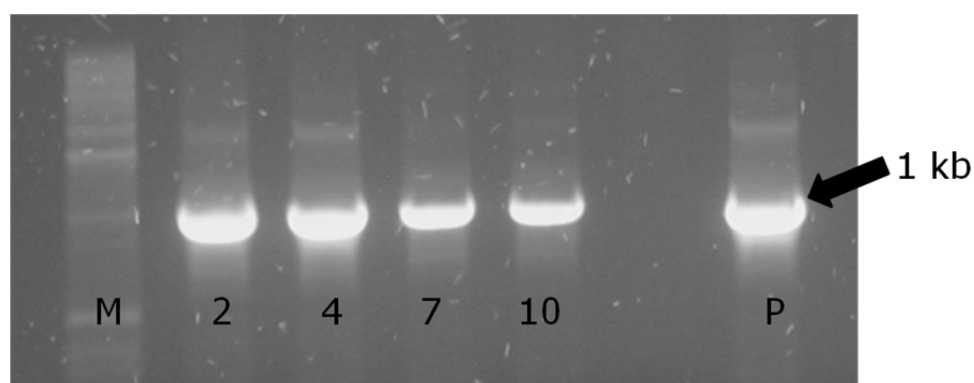


Figura 8: Eletroforese dos produtos de PCR realizados com o DNA da geração T1 de *Nicotiana tabacum* com os primers do promotor *G02172*. M: Marcador de peso molecular com 10 kb MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); 2, 4, 7 e 10: Eventos confirmados; P: Controle positivo.

A seguir, foi realizado o teste histoquímico de GUS para comprovar a estabilidade do gene *gus* na geração T1 (Figura 7). Houve formação de precipitados azuis comprovando a expressão da enzima β -glucuronidase e, portanto, do gene *gus*. As plântulas germinadas foram transferidas para meio de multiplicação para multiplica-las e mantê-las *in vitro*. Assim que houve material vegetal suficiente, foi extraído DNA das plantas T1 e realizada a PCR, para comprovar a inserção do promotor *G02172* (Figura 8). Foram usados os DNAs das plantas T1 dos eventos 2, 4, 7 e 10 e todos apresentaram a banda correspondente ao fragmento do promotor *G02172* (1 kb).

3.4 CONCLUSÃO

Foi possível validar o promotor *G02172* de *Eucalyptus grandis* em *Nicotiana tabacum*. O promotor *G02172* é funcional e possui atividade transcricional em tabaco. Este promotor é preferencialmente expresso em raízes e caules de plantas de *Nicotiana tabacum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAUDURO, Y. O. **Organogênese indireta em *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* e Transformação genética de *Eucalyptus saligna* e *Nicotiana tabacum***. Tese (Doutorado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

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

DE LA TORRE, F. *et al.* Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* using the vascular-specific EgCCR as an alternative to the constitutive CaMV35S promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, p. 77–84, 2014.

DOYLE, J.; DOYLE, L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

GITTINS, J.R. *et al.* The *Brassica napus* extA promoter: a novel alternative promoter to *CaMV35S* for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill.) **Molecular Breeding**, v. 7, p. 51–62, 2001.

GRUNENVALDT, R. L. **Clonagem de promotores raiz-específicos de *Eucalyptus grandis* e validação em *Nicotiana tabacum***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

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

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

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

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

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

RODRIGUES, M. I. *et al.* The tonoplast intrinsic aquaporin (TIP) subfamily of

Eucalyptus grandis: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. **Plant Science**, v. 213, p. 106–113, 2013.

SANTANA, R. H. **Isolamento e caracterização de promotores órgão-específicos de plantas de soja (*Glycine max*)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SHIRSAT, A. H. *et al.* Expression of a *Brassica napus* extensin gene in the vascular system of transgenic tobacco and rape plants. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 701–709, 1991.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. ASSISTAT Software Statistical Assistance In: Sixth International Conference on Computers in Agriculture, 2009, Cancun, México. **Anais...**Cancun: Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

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

VAN DER HOEVEN, C.; DIETZ, A.; LANDSMANN, J. Variability of organ-specific gene expression in transgenic tobacco plants. **Transgenic Research**, v. 3, p. 159–165, 1994.

VAUGHAN, S. P. *et al.* Characterization of *FaRB7*, a near root-specific gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) and promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3901–3910, 2006.

WEINZIERL, R. O. J. **Mechanisms of gene expression: structure, function and evolution of the base transcription machinery**. Londres: Imperial College Press, 1999.

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

CAPITULO 2

4 TRANSFORMAÇÃO DE *Populus tremula* x *P. alba* CLONE 717-1B4 COM O FATOR DE TRANSCRIÇÃO *CaHB12* DE TOLERÂNCIA À SECA

RESUMO

CaHB12, isolado de *Coffea arabica*, é um fator de transcrição da família HD-ZIP-I que está relacionado à tolerância a estresse hídrico. *CaHB12* foi estudado neste trabalho a fim de se comprovar essa relação com a tolerância à seca. Explantes foliares de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo pUCE*CaHB12* contendo o gene do fator de transcrição *CaHB12*. Foram confirmados via PCR oito eventos transformados com o gene *CaHB12*. Assim que foi comprovada a inserção do gene via PCR, realizou-se a análise de Southern Blot e, pelo padrão das bandas, foi possível concluir que quatro eventos eram o mesmo evento, visto que vieram do mesmo explante, e tinham duas cópias do gene *CaHB12*. Com o evento 1 foi realizado teste de estresse osmótico *in vitro* com 300 mM de manitol adicionado em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar. Nesse experimento, observou-se melhor desenvolvimento dos eventos do que das plantas controle, após 60 dias do início do estresse. Para as variáveis altura média, número médio de brotos, número médio de folhas e entrenós, as plantas transformadas tiveram maiores médias diferindo estatisticamente das plantas controle. Após 60 dias de estresse, as plantas foram usadas para a extração e quantificação de prolina, mas não houve diferença estatística entre as plantas transformadas e as controle. Assim que se obteve material vegetal suficiente, três eventos foram aclimatizados e, após 60 dias, avaliados morfológicamente. Não houve diferença estatística entre os eventos e as plantas controle, mostrando que as plantas não apresentaram fenótipo diferente da planta selvagem devido a presença do gene *CaHB12*. Os eventos e as plantas controle passaram por estresse hídrico severo com suspensão das regas por 15 dias. Neste experimento nenhuma planta sobreviveu. Assim, foi realizado novo experimento com estresse hídrico moderado. Após 15 dias, as variáveis número de folhas, comprimento de folhas e largura de folhas, diferiram estatisticamente, sendo que médias dos eventos foram maiores que as plantas controle. Assim, pode-se concluir que as plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 transformadas com o fator de transcrição *CaHB12* foram tolerantes à seca moderada e ao estresse osmótico *in vitro*.

Palavras-chave: estresse hídrico, HD-Zip-I, *AtHB12*.

CHAPTER 2

4 GENETIC TRANSFORMATION OF *Populus tremula* x *P. alba* WITH FACTOR TRANSCRIPTION *CaHB12* TOLERANCE TO DROUGHT

ABSTRACT

CaHB12, isolated from *Coffea arabica*, is a transcription factor of the HD-ZIP-I family related to water stress tolerance. *CaHB12* was studied in order to prove this relationship with drought tolerance. Leaf explants from *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* with the plasmid pUCE*CaHB12* containing the transcription factor gene *CaHB12*. Eight events transformed with the *CaHB12* gene were confirmed via PCR. Once the gene was inserted via PCR, Southern blot analysis was performed and, by the band pattern, it was possible to conclude that four events were the same event, since they came from the same explant, and contained two copies of the gene *CaHB12*. An in vitro osmotic stress test was applied to event 1, consisting of 300 mM mannitol added in MS culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and 7 g L⁻¹ agar. In this experiment, a better development of the events than of the control plants was observed 60 days after the beginning of the stress. For the variables mean height, mean number of shoots, average number of leaves and internodes, the transformed plants had higher mean values differing statistically from the control plants. After 60 days of stress, the plants were used for the extraction and quantification of proline, but there was no statistical difference between the transformed and control plants. As soon as enough plant material was obtained, three events were acclimatized and, after 60 days, evaluated morphologically. There was no statistical difference between the events and the control plants, showing that the plants did not present a phenotype different from the wild plant due to the presence of the *CaHB12* gene. Furthermore, the events and the control plants underwent a severe water stress with watering suspension for 15 days. In this experiment no plant survived. Thus, a new experiment with moderate water stress was carried out. After 15 days, the number of leaves, leaf length and width differed statistically, and the mean values of the events were higher than those of the control plants. Thus, it can be concluded that the plants of *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 transformed with the transcription factor *CaHB12* were tolerant to moderate drought and to osmotic stress in vitro.

Key words: water stress, HD-Zip-I, AtHB12.

4.1 INTRODUÇÃO

O estresse hídrico é o maior fator limitante na sobrevivência, no crescimento e na produtividade das plantas. O suprimento de água do mundo está cada vez mais limitado, aumentando a necessidade da redução da irrigação das áreas plantadas. A tolerância das plantas a estresses abióticos é uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada no melhoramento genético clássico (BEEVER, 2000).

Estudos mostram que a regulação transcricional em estresses de seca e salinidade, tanto pelas vias dependentes quanto pelas vias independentes de ABA (ácido abscísico), são mediadas por fatores de transcrição (FTs) (ZANDALINAS *et al.*, 2017). Fatores de transcrição são proteínas que se ligam em sequências específicas de DNA e induzem o início da transcrição de novos genes, desencadeando uma reação em cadeia. A identificação e caracterização de FTs que causam resistência ou tolerância à seca têm ampliado ainda mais as possibilidades de manipulações por processos biotecnológicos.

O gene do fator de transcrição *CaHB12* foi isolado de *Coffea arabica* e está relacionado ao estresse hídrico. Em estudos com o café, sua expressão foi aumentada quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (CRUZ *et al.*, 2007). O FT *CaHB12* é membro da família homeobox leucina zipper I (HD-Zip-I) e estudos revelaram que fatores pertencentes a esta família podem estar envolvidos na modulação de respostas das plantas à seca, controlando o desenvolvimento vegetal em tais condições (EMBRAPA, 2012). Plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o FT *CaHB12* mostraram maior tolerância ao estresse hídrico do que as plantas controle (EMBRAPA, 2012).

Além disso, este gene tem homologia ao *AtHB12*, o qual foi alvo de vários estudos de resistência a seca. O gene *AtHB12* foi isolado de *A. thaliana* e, em experimentos *in vitro* com essa planta, houve aumento dos níveis de expressão do gene quando foi adicionado ABA no meio de cultura, enquanto que não houve aumento da expressão de *AtHB12* quando adicionados outros hormônios, como AIA (ácido 3-indol-acético) (LEE; CHUN, 1998). Quando plantas de *Nicotiana tabacum* foram transformadas com *AtHB12* e submetidas ao estresse hídrico, houve aumento da expressão deste gene (LEE *et al.*, 2001). Esses autores também sugerem que a expressão de *AtHB12* é induzida pelo estresse hídrico mediado por ABA, além de ser um ativador transcricional importante na resposta ao estresse hídrico. Em outro

trabalho, quando as plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *AtHB12* foram submetidas ao estresse hídrico houve um aumento de níveis de ácido abscísico e, aparentemente por consequência, aumento da expressão do FT (OLSSON; ENGSTRÖM; SÖDERMAN, 2004).

Assim, o objetivo deste trabalho foi transformar *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 com o fator de transcrição *CaHB12* e testar as plantas transformadas para tolerância ao estresse hídrico.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação e no Laboratório de Biologia Molecular (CQB 302/10) pertencentes a Embrapa Florestas – CNPF, localizada em Colombo, Paraná.

4.2.1 Material Vegetal e condições gerais de cultura

Neste trabalho foram utilizadas plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 gentilmente cedidas pelo Dr. Gilles Pilate, INRA, França. As plantas foram mantidas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar e repicadas a cada 30 dias, sendo transferidas para meio fresco.

As culturas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 23 \pm 2°C. As culturas foram realizadas em frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 40 mL de meio de cultura.

4.2.3 Transformação de *Populus tremula* x *P. alba* via *Agrobacterium tumefaciens*

4.2.3.1 Cepa bacteriana e vetor binário

Para transformação genética das plantas foi utilizada a cepa *EHA105* de *Agrobacterium tumefaciens*, pertencente ao grupo de opina succinamopina (HOOD *et al.*, 1993), contendo o vetor binário pUCECaHB12. Este vetor contém o gene de seleção *ahas* que confere resistência ao herbicida imazapir e o gene *CaHB12*, ambos sob o controle do promotor *CaMV35S* (Figura 8). O plasmídeo pUCECaHB12 foi gentilmente cedido pelo Dr. Eduardo Romano, Embrapa Cernagen (Brasília, DF). Este plasmídeo foi patenteado sob o número de publicação WO 2012061911 A2 pela Embrapa (2012).

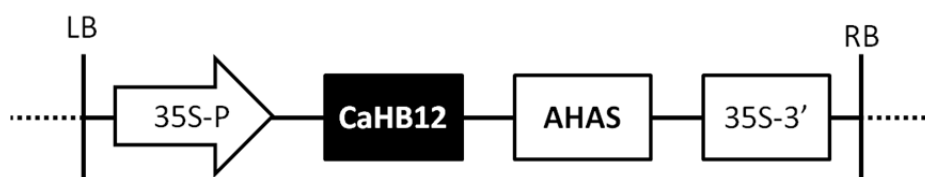


Figura 9 - T-DNA do plasmídeo pUCECaHB12 utilizado na transformação genética de *Populus tremula* x *P. alba*. LB: Borda esquerda do T-DNA; 35S-P: Promotor CaMV35S (vírus do Mosaico da Couve-Flor); *CaHB12*: fator de transcrição de resistência a seca; AHAS: gene que confere resistência ao herbicida imazapir; 35S-3': Terminador do CaMV35S; RB: Borda direita do T-DNA.

4.2.3.2 Condições de cultura da bactéria, inoculação e co-cultura

Os explantes usados na transformação foram folhas saudáveis de brotações micropropagadas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 e em cada transformação foram utilizados 300 explantes. As transformações foram repetidas semanalmente durante três meses. Foram realizadas 16 repetições deste protocolo de transformação. As folhas foram cortadas, mantendo-se o pecíolo e retirando a ponta da folha. Após o corte, os explantes foram pré-cultivados por três dias no escuro a 23°C em meio de cultura MSA (MS modificado) contendo sais e vitaminas do meio MS, 0,1 mg L⁻¹ de ácido fólico, 0,1 mg L⁻¹ de biotina, 0,269 µM de ANA (ácido naftaleno acético), 2,22 µM de BAP (benzilamino purina), 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar.

A bactéria foi cultivada *overnight* em meio LB líquido contendo 25 µM de espectinomicina, sob agitação de 220 rpm a 28°C, na noite anterior ao dia da transformação. No dia seguinte, foi medida a concentração da bactéria em espectrofotômetro, e a suspensão com OD_{600nm} entre 0,5 e 1,0, foi utilizada. Após a determinação da absorvância, a suspensão da bactéria crescida em meio LB foi centrifugada a 6000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em 50 mL de meio MS líquido, contendo apenas 30 g L⁻¹ de sacarose.

Após os três dias de pré-cultivo, os explantes ficaram em contato com a suspensão bacteriana sob agitação de 50 rpm em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, os explantes foram transferidos para o Meio MSA e mantidos por três dias no escuro a 23°C (co-cultivo). Após o co-cultivo, os explantes foram transferidos para o meio de cultura de seleção, meio MSA contendo 25 µM de imazapir e 250 mg L⁻¹ de amoxicilina.

Quinze dias, depois os explantes foram transferidos para luz e para meio de cultura fresco, mantendo-se as concentrações do antibiótico e do herbicida.

Assim que os explantes produziram brotos com ± 2 cm de altura, estes foram transferidos para o meio de multiplicação, meio MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 250 mg L⁻¹ de amoxicilina e 25 μ M de imazapir a fim de multiplicar os explantes putativos. A cada 30 dias, os explantes foram repicados para meio de multiplicação fresco.

4.3.4 Extração de DNA e análise de integração do transgene

Assim que os brotos de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 cultivados em meio de multiplicação cresceram cerca de 2 cm, folhas foram retiradas para a extração do DNA total pelo método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrito por Doyle e Doyle (1987). Foram coletadas 150 mg de folhas dos eventos putativos obtidos e do controle negativo (*Populus* não transformado) cultivados *in vitro*.

A análise das plantas transformadas foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do gene *CaHB12*. Para as reações de amplificação foram utilizados: 0,5 μ g/ μ L de DNA; 2,5 μ L de tampão (50 mM KCl; 0,1% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 8,8); 1 μ L MgCl₂ (50 mM); 2,5 μ L de dNTPs (10 mM); 1 μ L de cada *primer forward* e *reverse* (10 μ M cada) e 1 μ L de Taq polimerase, para um volume final de 25 μ L. Foram utilizados primers específicos F: 5' CGTATCGTCCCTCCCATGG 3' e R: 5' CATCTCGCATGCACTAGTTTAGC 3'.

As reações foram amplificadas em termociclador (Applied Biosystems), sendo: pré-ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e, ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,1% de brometo de etídio e visualizados em transiluminador, de maneira a avaliar a amplificação dos fragmentos.

4.3.5 Análise de Southern Blot

Para a realização do protocolo foi utilizado o kit DIG-High Prime DNA Labeling and Detection (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Aproximadamente 20 μ g de DNA de cada evento foram utilizados para a realização do Southern Blot. As

amostras de DNA foram digeridas utilizando a enzima EcoRI e foram incubadas overnight a 37°C. Em seguida, o DNA foi precipitado adicionando 150 µL de 7,5 M de acetato de amônio e 800 µL de etanol absoluto. A mistura foi centrifugada por 30 min a 13000 rpm. Os *pellets* foram lavados com 500 µL de etanol 70% e o DNA dissolvido em tampão TE.

As amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) numa corrida a 20 V *overnight*. O gel foi lavado com HCl 0,25M por 10 min e enxaguado 3 vezes com água destilada, em seguida ficou mergulhado no tampão de desnaturação (1.5 M de NaCl e 0.5 M de NaOH) por 30 min, enxaguado em água destilada e mergulhado no tampão de neutralização (1 M de Tris-HCl e 3 M de NaCl – pH 5,5) por 30 min. O DNA foi transferido para membrana de nylon por capilaridade na presença do tampão 20x SSC (3 M de NaCl e 300 mM de citrato de sódio) *overnight*. Depois da transferência, o DNA foi fixado na membrana por incubação a 80°C por 2h.

Na pré-hibridização, a membrana foi colocada no tubo de hibridização com DIG Easy Hyp (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) por 2h a 42°C. Após decorrido o tempo, foi adicionada a sonda para hibridizar e deixado overnight a 42°C para hibridização. A membrana foi lavada 2 vezes por 5 min com tampão de baixa estringência (2x de SSC e 0,1% de SDS) a 42°C e uma vez por 15 min com tampão de alta estringência (0.1x de SSC e 0,1% de SDS) a 65°C.

Para evitar a hibridização não específica, a membrana foi incubada por 2h com Blocking Solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes por 15 min com tampão de lavagem (tampão de ácido maleico [0.1 M de ácido maleico e 0.15 M de NaCl – pH 7.5] e 0,3% de Tween 20®).

Para visualização das bandas, a membrana de nylon foi exposta ao filme de raio-x por 24h e, em seguida, o filme foi imerso em solução reveladora e em solução fixadora por alguns segundos.

4.3.5.1 Preparo da Sonda

A sonda foi preparada usando o kit PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) com os primers do gene *CaHB12*, F: 5'

CGTATCGTCCCTCCCATGG 3' e R: 5' CATCTCGCATGCACTAGTTTAGC 3'. As reações foram amplificadas em termociclador, sendo: pré-ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos e, ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,1% de brometo de etídio e visualizados em transiluminador, de maneira a avaliar a amplificação dos fragmentos.

4.3.6 Estresse osmótico *in vitro*

Brotações de *P. alba* x *P. tremula* clone 717-1B4 não transformado e do evento 1 transformado, com 1,5 cm de comprimento, foram cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 300 mM de manitol. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 11 repetições por tratamento, onde cada repetição foi constituída de um frasco com três brotações. Após 30 dias, foram avaliados a porcentagem de sobrevivência, altura média em cm, o número médio de brotos, de folhas e entrenós por explante.

4.3.7 Determinação do teor de prolina

A quantificação da concentração de prolina foi realizada conforme protocolo descrito por Bates *et al.* (1973). Quinhentos miligramas do material estressado *in vitro* foram macerados com 10 mL de ácido sulfosalicílico a 3%. Em seguida, o macerado foi filtrado e transferido para um tubo de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfosalicílico, 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria por uma hora e, em seguida, resfriados no gelo. A leitura da concentração foi realizada em espectrofotometro em 520 nm. Além disso, foi realizada a curva padrão de prolina com padrão conhecido para determinar a concentração de prolina nas amostras. A concentração da prolina foi expressa em µM de prolina por grama de massa fresca.

4.3.8 Aclimatização

As plantas foram enraizadas em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar e pré-aclimatizadas em sala de crescimento por um período de 48 horas. A pré-aclimatização consistiu no afrouxamento da tampa dos frascos de cultura e na adição de 10 mL de água destilada (CAUDURO, 2013). As plantas foram retiradas dos frascos, as raízes lavadas para eliminação do meio de cultura e as plantas transferidas para vasos plásticos contendo solo e vermiculita (1:1). Quatro plantas dos eventos 1, 2A, 3 e o controle negativo foram aclimatizadas e mantidas em câmara climática para crescimento de plantas (Fitotron[®]) sob luz fluorescente branca fria com fluxo de fótons de 46,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 23°C \pm 2°C e umidade de 85% com regas diárias.

4.3.9 Análise morfológica

As plantas aclimatizadas foram avaliadas aos 60 dias para as seguintes variáveis morfológicas: número total de folhas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm) e altura da planta (cm). Foi calculada a média das quatro repetições.

4.3.10 Estresse Hídrico Severo

Após três semanas de aclimatização, as quatro plantas (repetições) dos três eventos e o controle receberam a última rega com 200 mL de água e pararam de receber água por 15 dias. As seguintes variáveis morfológicas foram analisadas: número total de folhas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm) e altura da planta (cm).

4.3.11 Estresse Hídrico Moderado

Após três semanas de aclimatização, as plantas foram regadas apenas uma vez na semana (100 mL de água) e as seguintes variáveis morfológicas foram analisadas após 15 dias: número de folhas, comprimento médio das folhas (cm), largura média das folhas (cm) e altura da planta (cm).

4.3.12 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. Para a análise estatística dos dados foi aplicado o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variâncias, foi realizada a análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional ASSISTAT® (SILVA e AZEVEDO, 2009).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após três meses do início dos experimentos de transformação, foram obtidos 28 brotos regenerados em meio de seleção. No entanto, após 30 dias em meio de seleção com imazapir, 20 brotos morreram, sugerindo que não estavam transformados. Seis brotos foram obtidos de um mesmo explante não sendo possível distinguir se eram o mesmo evento ou eventos separados. As oito plantas putativas regeneradas em meio de seleção foram mantidas em meio de multiplicação para sua clonagem, a fim de se obter material vegetal suficiente para a realização das análises moleculares.

Assim que os brotos putativos de *Populus* cresceram cerca de 2 cm, folhas foram retiradas para a extração do DNA total a fim de confirmar, via PCR, a integração do transgene. Os oito brotos putativos foram confirmados por PCR, no entanto, devido a seis brotos serem oriundos do mesmo explante, estes foram nomeados como eventos 2A, 2B, 2C, 2D, 2E e 2F (Figura 10). Pode-se concluir que a eficiência de seleção do imazapir foi de 100%, já que todos os brotos sobreviventes eram eventos transformados.

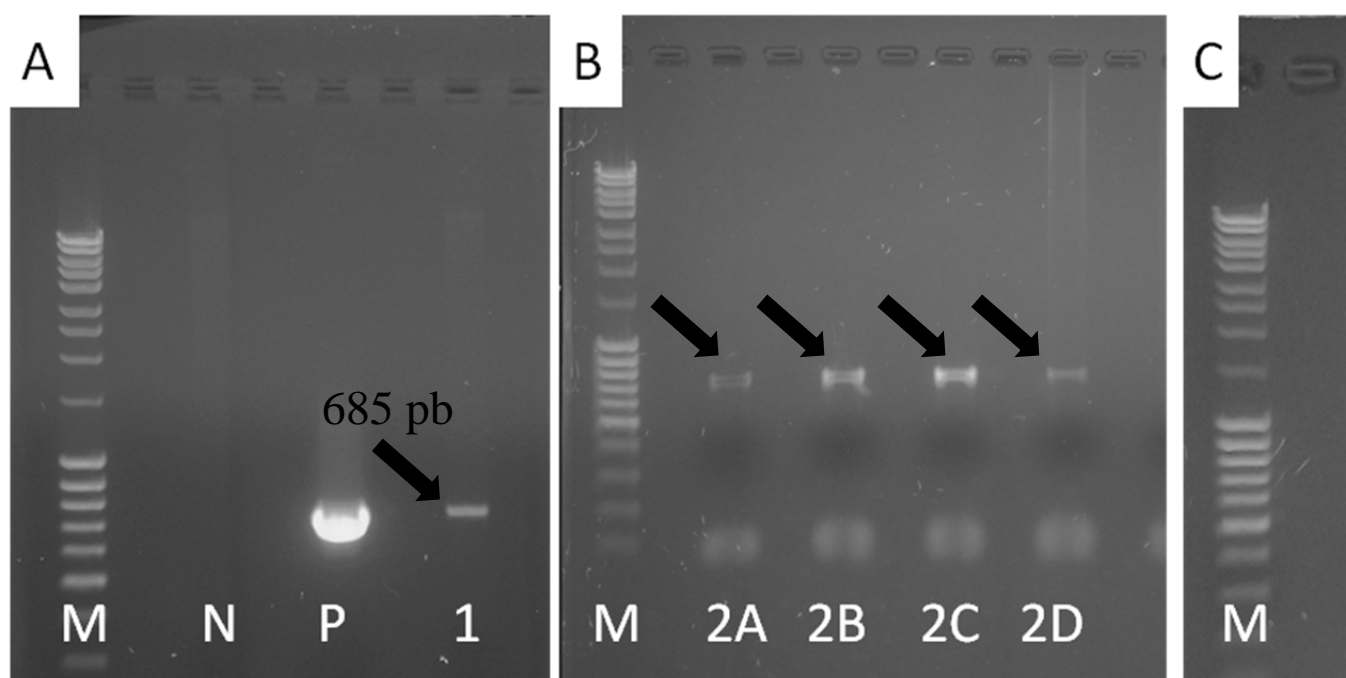


Figura 10: Resultados das eletroforeses dos produtos de PCR realizadas com o DNA de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 transformados com o gene *CaHB12*. M: Marcador de peso molecular com 10kb MassRuler DNA Ladder Mix

(Fermentas); 1, 2A, 2B, 2C, 2D e 3: Eventos confirmados. P: Controle positivo; N: Controle negativo. Setas indicam a banda do gene *CaHB12*.

Todos os eventos confirmados foram utilizados no Southern Blot a fim de comprovar a estabilidade do gene no genoma e identificar o número de cópias em cada evento. Além disso, com este teste é possível diferenciar os eventos 2, pelo número de cópias e padrão das bandas no gel. Para a realização desta técnica foi necessário preparar a sonda marcada que se ligou ao DNA das amostras. Para o preparo desta sonda foi realizada uma PCR e esta foi visualizada em um gel de agarose por eletroforese. Para fins de comparação, ao lado da sonda está um produto de PCR sem a sonda marcada (Figura 11-C), assim a PCR com a sonda marcada (Figura 11-S) ficará mais acima na corrida do gel por ser mais pesada e correr mais devagar (Figura 11).

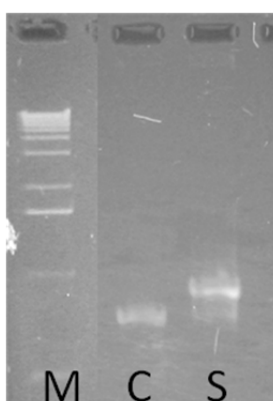


Figura 11. Gel de eletroforese com a sonda marcada e o fragmento do plasmídeo pUCECaHB12. M: Marcador Ladder com 1kpb; S: PCR com a sonda; C: PCR sem sonda como controle.

Assim que foi obtida a sonda marcada, foi realizado o Southern Blot. Pelo padrão das bandas concluiu-se que os eventos 2A, 2B, 2C e 2D são o mesmo evento (Figura 12). Além da diferenciação dos eventos, foi comprovada a inserção de duas cópias do gene *CaHB12* no evento, agora chamado 2A (Figura 12). Assim, foram utilizados três eventos para os testes morfológicos chamados de evento 1, evento 2A e evento 3.

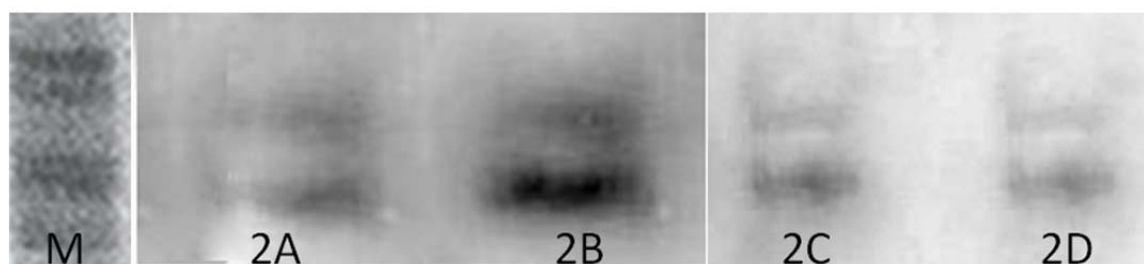


Figura 12. Análise de Southern Blot do DNA dos eventos 2A, 2B, 2C e 2D de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 transformados com o gene *CaHB12*.

CaHB12 sendo homólogo a *AtHB12*, foi realizado teste de cultura de segmentos nodais *in vitro* sob estresse osmótico com manitol. Para as variáveis número de brotos, número de folhas, entrenós e altura houve diferença estatística, entre as médias o evento 1 obteve as maiores médias, mostrando que o evento se desenvolveu melhor do que o controle não transformado (Figura 13 – Tabela 3 – Anexos 9, 10, 11, 12 e 13). Assim, pode-se afirmar que o gene *CaHB12* teve influência no desenvolvimento dos brotos do evento 1 de *P. alba* x *P. tremula* clone 71-1B4.

O fator de transcrição *CaHB12* tem homologia com o gene *AtHB12*, isolado de *A. thaliana*, o qual está envolvido no início da transcrição de uma série de genes que codificam proteínas receptoras de ácido abscísico (LEE *et al.*, 2001). Plantas de *A. thaliana* transformadas com *AtHB12* foram submetidas a estresse osmótico *in vitro* com manitol e houve um aumento de oito vezes na expressão de *AtHB12* quantificado por qPCR (RÉ *et al.*, 2014). Para estudar os efeitos do estresse hídrico em plantas, experimentos *in vitro* são frequentemente usados como uma possível representação dos complexos ambientes de campo em que as plantas são submetidas ao estresse (CLAEYS *et al.*, 2014). A seca é geralmente simulada pela adição de compostos osmóticos, como o manitol, que reduz o potencial hídrico do meio de cultura, tornando mais difícil a extração de água pelas plantas, simulando o que acontece na seca do solo (VERSLUES *et al.*, 2006).

Quando plantas de *A. thaliana* foram submetidas ao estresse hídrico moderado em casa de vegetação, houve um aumento dos níveis de expressão de *AtHB12*, assim como no experimento de estresse osmótico induzido por manitol (RÉ *et al.*, 2014). Além do gene *AtHB12*, o gene *HaHB4* também tem certa homologia ao *CaHB12*, o qual foi isolado de girassol, *Helianthus annuus* (GAGO *et al.*, 2002).

Plantas de girassol também foram submetidas ao estresse hídrico *in vitro* com manitol e ao estresse hídrico em casa de vegetação a fim de investigar a expressão do gene *HaHB4* (GAGO *et al.*, 2002). Em ambos os experimentos houve um aumento da expressão do gene *HaHB4*, no entanto houve maior expressão nas plantas submetidas ao estresse hídrico em casa de vegetação do que nas plantas *in vitro* (GAGO *et al.*, 2002).

CaHB12 é um fator de transcrição da família homeobox leucina zipper I (HD-Zip-I), a qual está relacionada ao desenvolvimento da planta e é regulada por fatores ambientais, como seca, altas temperaturas e estresse osmótico (AGALOU *et al.*, 2008), o que explicaria o melhor desenvolvimento dos explantes do evento 1 do que o controle. Membros da superfamília HD-Zip têm diversas funções regulatórias no desenvolvimento de embriões, polaridade de órgãos, desenvolvimento vascular e atividade de meristemas (SON *et al.*, 2010).

Tabela 3. Avaliação do evento 1 de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 transformado com o gene *CaHB12* e do controle não transformado após cultivo *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 300 mM de manitol 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar.

	Sobrevivência %	Nº de brotos	Nº de folhas	Entrenós	Altura cm
Evento 1	93,9 a	1,54 a	5.38 a	2,10 a	6,6 a
Controle	84,8 a	1,14 b	3.53 b	0,98 b	3,7 b
CV%	17,46	29,89	29,50	43,31	31,36

Análise estatística a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

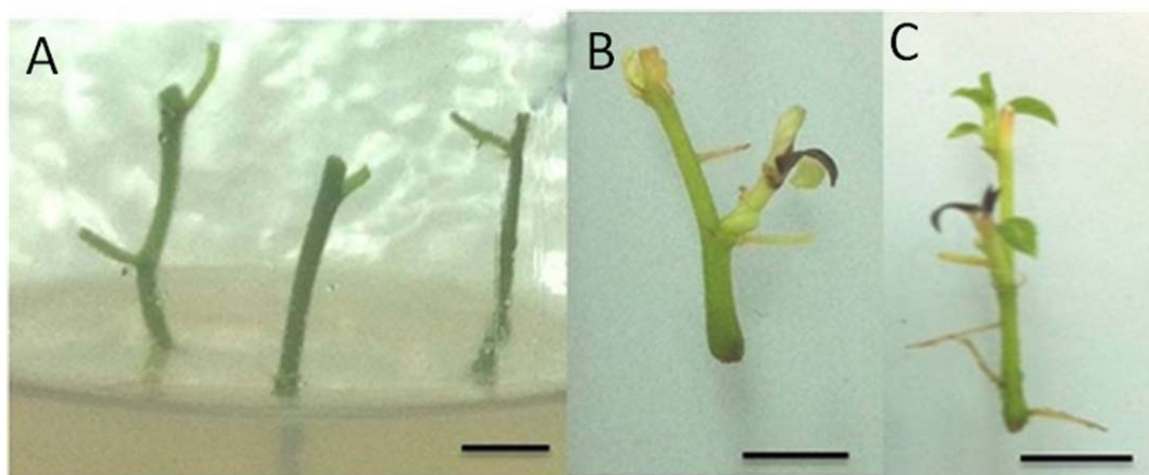


Figura 13. Brotos de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 cultivados *in vitro* em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar e 300 mM de manitol. A: Início do experimento, foram utilizados segmentos nodais com duas gemas como explante inicial; B: Broto controle não transformado com 60 dias em meio contendo manitol; C: Evento 1 transformado com o gene *CaHB12* com 60 dias em meio contendo manitol. Barra = 1 cm.

Foi investigado se houve maior aumento da concentração de prolina nas plantas transformadas submetidas a estresse do que nas não transformadas igualmente estressadas. Na planta não transformada o teor de prolina foi de 201,3 enquanto que na transformada foi 226 µmol de prolina/g de massa fresca e não houve diferença estatística entre estes resultados. Além disso, não há relatos de avaliação de prolina em outros trabalhos com o gene *CaHB12* ou com seus homólogos, *AthB12* e *HaHB4*. Sob estresse abiótico, a acumulação de osmoprotetores é uma resposta comum da planta visando estabilizar proteínas e membranas e contribuir para a pressão osmótica celular (ZANDALINAS *et al.*, 2017).

Logo que se obteve material vegetal suficiente, as plantas transformadas foram aclimatizadas e, após 60 dias, analisadas morfológicamente. Nenhum dos eventos diferiu estatisticamente das plantas não transformadas para as variáveis morfológicas analisadas (número de folhas, comprimento médio das folhas, largura média das folhas, entrenós e altura da planta) (Tabela 4 – Anexos 14, 15, 16 e 17). Este resultado mostra que a presença do gene *CaHB12* no genoma do *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 não alterou o fenótipo dos eventos. Uma grande variedade de plantas transgênicas tolerantes ao estresse hídrico apresenta retardo no crescimento e modificações morfológicas (YAMAGUCHI-SHINOZAKI e SHINOZAKI, 2006). Esta foi a primeira vez que este gene isolado do café, ou dos seus homólogos isolados de *A. thaliana* ou de girassol, foi inserido em uma espécie florestal. O fato das plantas terem a sua morfologia inalterada é um resultado muito promissor para que este gene seja usado em espécies comerciais. A presença do gene *AtHB12* também não alterou morfológicamente as plantas transformadas em outros trabalhos (LEE *et al.*, 2001; OLSSON; ENGSTRÖM; SÖDERMAN, 2004; RÉ *et al.*, 2014).

Tabela 4. Avaliação morfológica dos eventos 1, 2A e 3 transformados com o gene *CaHB12* e do controle não transformado de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 avaliados após 60 dias de aclimatização.

	Nº folhas*	Comprimento folhas (cm)*	Largura folhas (cm)*	Altura da planta (cm)*
Controle	10,25	9,00	5,00	26,75
Evento 1	11,50	9,50	4,25	25,00
Evento 2A	11,25	8,75	4,50	26,00
Evento 3	12,00	10,25	5,75	27,00
%CV	17,16	19,60	17,57	9,19

*: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Após 60 dias aclimatizados, os eventos passaram pelo experimento de estresse hídrico em Fitotron[®], com luminosidade, temperatura e umidade controladas. No primeiro experimento, foi realizado um estresse severo onde todas as plantas morreram aos 14 dias (Figura 14). Não foi possível identificar diferenças entre os eventos e as plantas controles. Experimento semelhante foi realizado com este gene em plantas de café, onde houve a suspensão total da rega com plantas em casa de vegetação (CRUZ *et al.*, 2007). Estes autores avaliaram a expressão gênica e concluíram que houve aumento da expressão do gene com 10 dias de estresse, no entanto não houve avaliação morfológica para fins de comparação. Estes mesmo autores concluíram ainda que houve maior expressão do gene em folhas de café, quando comparado com caule e raiz.

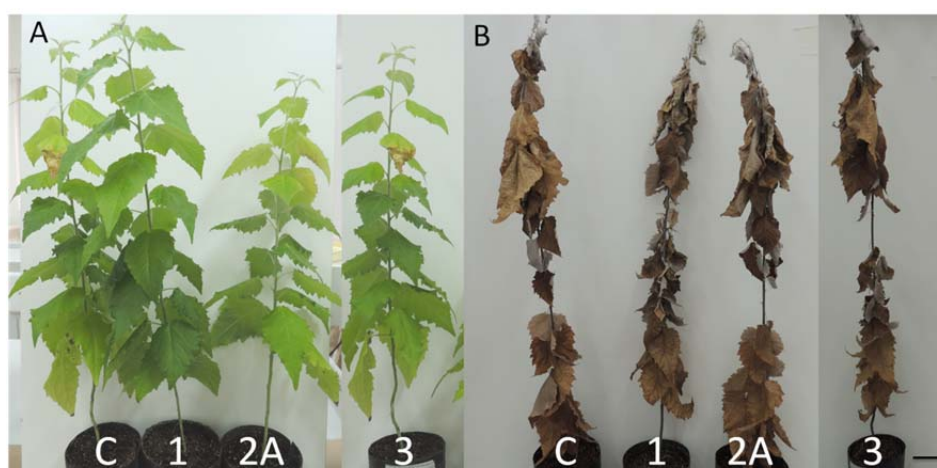


Figura 14. Plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 sob estresse hídrico severo, com 15 dias sem rega. 1, 2A, 3: Eventos transformados com o gene *CaHB12*. C: Controle não transformado. A: Plantas no início do experimento; B: Plantas sob estresse hídrico após 15 dias. Barra = 5 cm.

Assim, um experimento de seca moderada foi realizado com novas plantas aclimatizadas a fim de perceber diferenças entre os eventos e as plantas controle. Neste experimento, houve rega semanal para todas as plantas e, ao fim de 15 dias, estas foram avaliadas. Uma resposta rápida ao estresse hídrico é a inibição da expansão foliar, já que com menos água as células tem menor pressão de turgor. Essa inibição da expansão foliar pode ter acontecido neste experimento com as plantas controle, já que tiveram as menores médias de comprimento e na largura das folhas (Tabela 5, Figura 15). Assim, pode-se afirmar que as plantas controle sofreram mais por causa do estresse que as transformadas, as quais tiveram maiores médias para todas as variáveis analisadas, principalmente em relação ao comprimento da folha. Para esta variável todos os eventos diferiram do controle, enquanto que para largura das folhas os eventos 1 e 2A não diferiram estatisticamente do controle.

Além da inibição foliar, o déficit hídrico aumenta a produção do etileno, hormônio que estimula a abscisão foliar. Este efeito pode ser visualizado no número de folhas que se mantiveram nas plantas, onde as controle tiveram uma média de 4 folhas que permaneceram após os 15 dias de estresse hídrico. Já as plantas transformadas, mantiveram de 5 a 7 folhas em média, mostrando que apesar de ter havido um estímulo para a abscisão foliar, elas conseguiram manter um número maior de folhas que as controle. As médias das plantas controle diferiram estatisticamente das médias dos eventos 2A e 3, mas não diferiram do evento 1 (Tabela 5 – Anexos 18, 19, 20 e 21). Plantas de *A. thaliana* transformadas com o gene *CaHB12* também mostraram maior tolerância ao estresse hídrico do que as plantas não transformadas (EMBRAPA, 2012). Assim, o gene *CaHB12* influenciou positivamente a tolerância à seca das plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4.

Tabela 5. Avaliação morfológica dos eventos 1, 2A e 3 transformados com o gene *CaHB12* e do controle não transformado de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 sob estresse hídrico moderado por 15 dias.

	Nº folhas	Comprimento Folhas (cm)	Largura Folhas (cm)	Altura (cm)
Controle	4,0 b	4,0 c	2,6 b	48,0 a
Evento 1	5,6 ab	6,4 b	3,8 b	42,3 a

Evento 2A	6,3 a	8,3 a	4,0 ab	43,6 a
Evento 3	7,0 a	8,6 a	5,6 a	47,0 a
%CV	11,68	7,24	15,31	12,04

Análise estatística a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Figura 15. Plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 sob estresse hídrico moderado. 1, 2A, 3: Eventos transformados com o gene *CaHB12*. C: Controle não transformado. A: Plantas no início do experimento; B: Plantas sob estresse hídrico após 15 dias. Barra = 5 cm.

4.5 CONCLUSÃO

Plantas de *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4, transformadas com o fator de transcrição *CaHB12*, são mais tolerantes ao estresse hídrico moderado e ao estresse osmótico *in vitro* com manitol que plantas controle.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALOU, A. *et al.* A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. **Plant Molecular Biology**, v.66, p. 87-103, 2008.

BATES, L. S. *et al.* Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205–207, 1973.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, v.15, p. 4-7, 2000.

CAUDURO, Y. O. **Organogênese indireta em *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* e Transformação genética de *Eucalyptus saligna* e *Nicotiana tabacum***. Tese (Doutorado em Agronomia) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CLAEYS, H. *et al.* What is stress? Dose-response effects in commonly used *in vitro* stress assays. **Plant Physiology**, v. 165, p. 519–527, 2014.

CRUZ, F. P. *et al.* Identificação através de genômica funcional de três genes homeobox envolvidos com a resposta ao estresse hídrico em café a partir de dados do banco genoma café. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA Café, 2007.

DOYLE, J.; DOYLE, L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Marcio Alves Ferreira *et al.* **Use of the coffee homeobox gene *CaHB12* to produce transgenic plants with greater tolerance to water scarcity and salt stress**. WO 061911:A2, 8 Nov. 2011, 18 Maio 2012.

GAGO, G. M. *et al.* Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 633–640, 2002.

HOOD, E. E. *et al.* New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v. 2, p. 207—218, 1993.

LEE, Y. H. *et al.* Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *Athb-12*. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications v. 284, p. 133–141, 2001.

LEE, Y. H.; CHUN, J. Y. A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. **Plant molecular biology** v. 37, p. 377–384, 1998.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651–681, 2008.

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

OLSSON, A. S. B.; ENGSTRÖM, P.; SÖDERMAN, E. The homeobox genes *ATHB12* and *ATHB7* encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 663–677, 2004.

RÉ, D. *et al.* *Arabidopsis AtHB7* and *AtHB12* evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 150, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. ASSISTAT Software Statistical Assistance In: Sixth International Conference on Computers in Agriculture, 2009, Cancun, México. **Anais...Cancun: Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SON, O. *et al.* *ATHB12*, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of *Arabidopsis*, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. **Plant and Cell Physiology** v. 51, p. 1537–1547, 2010.

VERSLUES, P. E. *et al.* Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, p. 523–539, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

ZANDALINAS, S. I. *et al.* Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 12, p. 123–135, 2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas de tabaco transformadas com o promotor *G02172* apresentaram expressão do gene *gus* em todas as suas partes (folha, caule e raiz), no entanto houve maior expressão nos caules e raízes destas plantas. É possível que o tamanho do promotor tenha influenciado esta expressão, sendo importante, portanto, testar outros tamanhos com mais nucleotídeos para uma expressão mais específica. Outro caminho a seguir seria estressar as plantas de tabaco adultas, já que o gene do promotor *G02172* possui um domínio proteico característico de proteínas que respondem a estresses.

As plantas de *Populus* transformadas com o fator de transcrição *CaHB12* foram mais tolerantes a seca moderada do que as não transformadas. Contudo, testes fisiológicos devem ser realizados com essas plantas a fim de se analisar as mudanças fisiológicas que levaram a essa tolerância. Além disso, amostras das plantas foram coletadas para, futuramente, ser realizada anatomia e PCR em tempo real dessas plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- AGALOU, A. et al. A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members. **Plant Molecular Biology**, v.66, p. 87-103, 2008.
- CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; et al. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.
- CASAGRANDE, E. C. et al. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** v. 13, n. 2, p. 168–184, 2001.
- CHEN, L.; JIANG, B.; WU, C. The characterization of *GmTIP*, a root-specific gene from soybean, and the expression analysis of its promoter. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 259–274, 2015.
- CHEON, B.Y. et al. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis*. **Transgenic Research**, v. 13, p. 541–549, 2004.
- CHERIAN, S. et al. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: Progress and future prospects. **Journal Biologia Plantarum**, v. 50, p. 481–495, 2006.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. et al. Salt Stress Signaling and Mechanisms of Plant Salt Tolerance. In: SETLOW, J. K. (Ed.) **Genetic Engineering: Principles and Methods**. Nova York: Springer US, p. 141-177, 2006.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Marcio Alves Ferreira et al. **Use of the coffee homeobox gene *CaHB12* to produce transgenic plants with greater tolerance to water scarcity and salt stress**. WO 061911:A2, 8 Nov. 2011, 18 Maio 2012.
- FEI, H. et al. Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. **Planta**, v. 216, n. 3, p. 467–474, 2003.
- FOSTER, G. D.; TAYLOR, S. **Plant Virology Protocols**. Reino Unido: Humana Press, 1998.
- FRAISIER, V. et al. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana glauca*: Evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 489–496, 2000.
- GAGO, G. M. et al. Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 633–640, 2002.
- GROTEWOLD, E. Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet? **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.138–144, 2008.
- GUSEMAN, J. M. et al. *DRO1* influences root system architecture in *Arabidopsis* and *Prunus* species. **The Plant Journal**, v. 89, p. 1093-1105, 2016.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: A model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p 413–434, 1999.
- HENRIKSSON, E. et al. Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships. **Plant physiology**, v. 139, n. 1, p. 509–518, 2005.
- HERNANDEZ-GARCIA, C. M.; FINER, J. J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v. 217–218, p. 109–119, 2014.
- HOOD, E. E. et al. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. **Transgenic Research**, v. 2, p. 207–218, 1993.
- HUANG, L. et al. Identification and validation of root-specific promoters in rice. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.
- JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO journal**, v. 6, n. 13, p. 3901–7, 1987.
- JEONG, J.S. et al. Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. **Plant Physiology**, v. 153, p. 185–197, 2010.

- JONES, M. O. *et al.* The promoter from SIREO, a highly-expressed, root-specific *Solanum lycopersicum* gene, directs expression to cortex of mature roots. **Functional Plant Biology**, v. 35, n. 12, p. 1224–1233, 2008.
- KUREK, I. *et al.* Overexpression of the wheat FK506-binding protein 73 (FKBP73) and the heat-induced wheat FKBP77 in transgenic wheat reveals different functions of the two isoforms. **Transgenic Research**, v. 11, p. 373–379, 2002.
- LARCHER W. **Physiological plant ecology**. Springer, Verlag; 2003.
- LAWLOR, D. W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany**, v. 89, p. 871–885, 2002.
- LEE, Y. H. *et al.* Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *Athb-12*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 284, p. 133–141, 2001.
- MITSUUDA, N.; TAKAGI, M.O. Functional analysis of transcription factors in *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 50, n.7, p.1232–1248, 2009.
- MOLINARI, H. B. C. *et al.* Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, p.1375–1381, 2004.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651–681, 2008.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- NITZ, I. *et al.* Pyk 10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 161, p. 337–346, 2001.
- PREISZNER, J. *et al.* Structure and activity of a soybean *Adh* promoter in transgenic hairy roots. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 8, p. 763–769, 2001.
- RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p.1–19, 2008.
- RÉ, D. *et al.* *Arabidopsis* *AtHB7* and *AtHB12* evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 150, 2014.
- SHEN, J. *et al.* The NAC-type transcription factor OsNAC2 regulates ABA-dependent genes and abiotic stress tolerance in rice. **Scientific Reports**, v.12, p. 1–14, 2017.
- SHIN, D. *et al.* *Athb-12*, a homeobox-leucine zipper domain protein from *Arabidopsis thaliana*, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 534–540, 2004.
- SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. **Plant Physiology**, v. 115, p. 327–334, 1997.
- SIERRO, N. *et al.* The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v.5, p. 1–9, 2014.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. ASSISTAT Software Statistical Assistance In: Sixth International Conference on Computers in Agriculture, 2009, Cancun, México. **Anais...Cancun: Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.
- SON, O. *et al.* *ATHB12*, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of *Arabidopsis*, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene. **Plant and Cell Physiology** v. 51, p. 1537–1547, 2010.
- SRINIVAS, V.; BALASUBRAMANIAN, D. Proline is a protein-compatible hydrotrope. **Langmuir**, v. 11, p. 2830–2833, 1995.
- STRACKE, R.; WERBER, M.; WEISSHAAR, B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 447–456, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ARTMED. p.75–93, 2004.
- TAYLOR, G. *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? **Annals of Botany**, v. 90, n. 6, p. 681–689, 2002.
- UDVARDI, M. K. *et al.* Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. **Plant Physiology**, v.144, p. 538–549, 2007.
- VALDÉS, A.E. *et al.* Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v.79, p. 263–276, 2013.
- WEI, H. *et al.* Nitrogen deprivation promotes *Populus* root growth through global transcriptome reprogramming and activation of hierarchical genetic networks. **New Phytologist**, v. 200, p. 483–497, 2013.
- XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. da UFV, 2013.
- XIAO, K *et al.* Isolation and Characterization of Root-Specific Phosphate Transporter Promoters from

Medicago truncatula. **Plant Biology** v. 8, p. 439–449, 2006.

XU, R. *et al.* The 73 kD subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex affects reproductive development in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 61, p. 799–815, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781–803, 2006.

6 ANEXOS

CAPITULO 1

ANEXO 1 – Resumo da análise de variância da variável número de folhas da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	14.80833	1.64537	1.4447
Resíduos	30	34.16667	1.13889	
Total	39	48.97500		

ANEXO 2 – Resumo da análise de variância da variável comprimento de folhas da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	13.59615	1.51068	0.2093
Resíduos	30	216.57718	7.21924	
Total	39	230.17333		

ANEXO 3 – Resumo da análise de variância da variável largura de folhas da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	12.41747	1.37972	1.2823
Resíduos	30	32.27895	1.07597	
Total	39	44.69643		

ANEXO 4 – Resumo da análise de variância da variável entrenós da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	2.53635	0.28182	0.5719
Resíduos	30	14.78375	0.49279	
Total	39	17.32010		

ANEXO 5 – Resumo da análise de variância da variável número de flores da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	2.5335	0.28182	0.5719
Resíduos	30	14.78375	0.49279	

Total	39	17.32010
-------	----	----------

ANEXO 6 – Resumo da análise de variância da variável número de botões da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	30.58333	3.39815	1.9983
Resíduos	30	51.01667	1.70056	
Total	39	81.60000		

ANEXO 7 – Resumo da análise de variância da variável altura das plantas da avaliação morfológica de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	9	1099.850000	122.20556	1.0285
Resíduos	30	3564.550000	118.81833	
Total	39	4664.40000		

ANEXO 8 – Resumo da análise de variância da variável germinação das plântulas de *Nicotiana tabacum* controle, transformadas com o promotor *G02172* e transformadas com o promotor *CaMV35S* germinadas em higromicina (Geração T1):

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	11	766.89574	69.71779	18.3023
Resíduos	102	388.54286	3.80924	
Total	113	1155.43860		

CAPITULO 2

ANEXO 9 – Resumo da análise de variância da variável sobrevivência da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse osmótico *in vitro*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	456.36545	456.36545	1.8750
Resíduos	20	4867.89818	243.39491	
Total	21	5324.26364		

ANEXO 10 – Resumo da análise de variância da variável número de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse osmótico *in vitro*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	0.84829	0.84829	5.2535
Resíduos	20	3.22945	0.16147	
Total	21	4.07775		

ANEXO 11 – Resumo da análise de variância da variável número de brotos da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse osmótico *in vitro*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	18.78677	18.78677	10.8361
Resíduos	20	34.67431	1.73372	
Total	21	53.46108		

ANEXO 12 – Resumo da análise de variância da variável entrenós da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse osmótico *in vitro*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	6.91040	6.91040	15.4911
Resíduos	20	8.92178	0.44609	
Total	21	15.83219		

ANEXO 13 – Resumo da análise de variância da variável altura da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse osmótico *in vitro*:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	1	0.45965	0.45965	17.1008
Resíduos	20	0.53758	0.02688	
Total	21	0.99724		

ANEXO 14 – Resumo da análise de variância da variável número de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	2.68750	0.89583	0.2275
Resíduos	12	47.25000	3.93750	
Total	15	49.93750		

ANEXO 15 – Resumo da análise de variância da variável comprimento de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	5.25000	1.75000	0.5185
Resíduos	12	40.50000	3.37500	
Total	15			

ANEXO 16 – Resumo da análise de variância da variável largura de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	0.50000	0.16667	0.2667
Resíduos	12	7.50000	0.62500	
Total	15	8.00000		

ANEXO 17 – Resumo da análise de variância da variável altura das plantas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	0.50000	0.16667	0.2076
Resíduos	12	72.5000	6.04167	
Total	15	73.0000		

ANEXO 18 – Resumo da análise de variância da variável número de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse hídrico moderado:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	11.57576	3.85859	8.1030
Resíduos	7	3.33333	0.47619	
Total	10	14.90909		

ANEXO 19 – Resumo da análise de variância da variável comprimento de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse hídrico moderado:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	32.47636	10.82545	40.7410
Resíduos	7	1.86000	0.26571	
Total	10			

ANEXO 20 – Resumo da análise de variância da variável largura de folhas da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse hídrico moderado:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	12.07394	4.02465	0.9432
Resíduos	7	2.83333	0.4047	
Total	10	14.90727		

ANEXO 21 – Resumo da análise de variância da variável altura da avaliação morfológica de *Populus tremula* x *P. alba* clone 71-1B4 sob estresse hídrico moderado:

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrado médio	F
Tratamentos	3	56.66667	18.88889	0.6439
Resíduos	7	205.33333	29.33333	
Total	10	262.00000		