



VANESSA DINIZ BARCELOS VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO PROMOTOR DO
GENE *AnatrC* DE *Aspergillus nidulans* NA
PLANTA MODELO *Setaria viridis***

LAVRAS – MG

2014

VANESSA DINIZ BARCELOS VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO PROMOTOR DO GENE *AnatrC* DE
Aspergillus nidulans NA PLANTA MODELO *Setaria viridis***

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Alan Carvalho Andrade

Coorientador

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Vasconcelos, Vanessa Diniz Barcelos.

Avaliação funcional do promotor do gene *anatrC* de *Aspergillus nidulans* na planta modelo *Setaria viridis* / Vanessa Diniz Barcelos Vasconcelos. – Lavras : UFLA, 2014.

66 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Alan Carvalho Andrade.

Bibliografia.

1. Promotor *atrC*. 2. Cana-de-açúcar. 3. *Setaria viridis*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.920415

VANESSA DINIZ BARCELOS VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO PROMOTOR DO GENE *AnatrC* DE
Aspergillus nidulans NA PLANTA MODELO *Setaria viridis***

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2014.

Dr. Pierre Roger Marraccini UFLA/ CIRAD

Dra. Polyana Kelly Martins EMBRAPA Agroenergia

Dr. Alan Carvalho Andrade
Orientador

Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Coorientador

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu realizasse o sonho de alcançar o meu título de mestre.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES-EMBRAPA, por me conceder a bolsa de estudos.

Aos professores, que compartilharam dos seus conhecimentos.

Ao professor orientador Dr. Alan Carvalho Andrade, que contribuiu para o acréscimo de minha experiência na pesquisa e no conteúdo teórico.

Ao coorientador Dr. Hugo Bruno Correa Molinari, que confiou em mim para realizar o projeto.

Ao professor Dr. Pierre Marraccini, pelos conhecimentos transmitidos.

À equipe do LGM, que muito me ajudou, não apenas no projeto, mas pela amizade. Edriana, Érica, Fernanda, Karoline, Sinara e Tatiana.

Aos meus familiares, que mesmo de longe sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

Às minhas amigas, Tatiana e Adriana, que mesmo longe sempre me apoiaram.

À minha amiga, Gabi que me acolheu quando mais precisei.

Aos meus pais, que abriram mão de seus objetivos para que eu alcançasse o meu mestrado.

À minha irmã, que sempre acreditou em mim e me incentivou.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse meu objetivo.

RESUMO

A cana-de-açúcar tem um papel fundamental na economia do Brasil, pois contribui para o setor açucareiro e biocombustível. O bagaço da cana é uma rica fonte para a produção de bioetanol, um processo ainda inviável, em nível comercial, pelo custo benefício. Mas, com o desenvolvimento de alternativas viáveis para a degradação da parede celular da cana-de-açúcar sem a necessidade de altas temperaturas e ácidos fortes, poderia viabilizar economicamente a produção deste biocombustível, sem a necessidade de aumento da área de plantio. Uma das alternativas em estudo é a engenharia genética de plantas com a degradação controlada da parede celular, ao final do ciclo de produção. Desta forma, a identificação de promotores com indução regulada em plantas é extremamente desejável para serem utilizados na geração de plantas transgênicas com expressão controlada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do promotor do gene *atrC*, isolado do fungo *Aspergillus nidulans*, em controlar a expressão do gene *uidA* (*GUS*), na planta modelo *Setaria viridis*. Esse promotor foi escolhido devido à indução em presença de baixas concentrações de etanol, identificada em estudos anteriores (ANDRADE, 2000). Uma análise *in silico* inicial da sequência do promotor *atrC* foi realizada utilizando o programa *PlantCare*, com o objetivo de se identificar elementos *cis*, elementos esses presentes em promotores regulados, resultando na identificação de vários elementos na sequência do promotor. Posteriormente, foram realizados ensaios de transformação genética com a construção contendo o promotor *atrC:uidA* na planta modelo *S. viridis* via *Agrobacterium tumefaciens*. Após comprovação das plantas transformadas, ensaios foram montados para testes histoquímicos, e verificando-se atividade endógena de *GUS* em *S. viridis*. Análises para otimização dos ensaios histoquímicos foram realizados, constatando-se uma alta atividade endógena em soluções de pH mais ácido. Estabelecidas as condições ideais, foram realizados testes histoquímicos com a finalidade de verificar a eficiência do promotor em controlar a expressão do gene *uidA*, na presença de diferentes compostos químicos. Os resultados confirmaram a indução do promotor *atrC* em raízes, por etanol e ciclohexamida. Essa indução por etanol também foi confirmada em experimentos de qPCR.

Palavras-chave: Promotor *atrC*. Cana-de-açúcar. *Setaria viridis*.

ABSTRACT

The sugarcane is an important crop in the Brazil's economy, because plays an essential role for the sugar sector and biofuel. The cane bagasse is a rich source for the bioethanol obtention, an even infeasible process on the commercial level, if it considers the cost-benefit analysis. The development of viable alternatives for the cell-wall degradation in sugarcane, with no need of high temperatures and strong acids, could make economically viable the obtention of this biofuel without the need of increase of planting area. One of alternatives is the plant genetic engineering, with the controlled degradation of cell-wall at the end of the production cycle. Thus, the identification of promoters with regulated induction in plants is highly desirable for the obtention of transgenic plants containing controlled expression. This work was performed aiming to assess the efficiency of the *atrC* gene promoter in controlling the expression of the *uidA* gene (GUS) in a model plant, *Setaria viridis*. The promoter was isolated from the fungus *Aspergillus nidulans*, and was chosen due to its induction ability under low ethanol concentration, previously found in Andrade (2000). An initial in-silico gene expression analysis of the sequence of the *atrC* gene was carried out using the PlantCare program for identifying cis elements, which are present on regulated promoters, resulting in the identification of several elements in the promoter sequence. Subsequently were performed genetic transformation tests using a design containing the *atrC: uidA* promoter in *Setaria viridis* via *Agrobacterium tumefaciens*. After verification of transformed plants, experiments were performed for histochemical tests, and endogenous GUS activity in *Setaria viridis*. Experiments for optimization of these histochemical testings were also performed, from which was found a high endogenous activity under solution of the most acid pH. Once established optimal conditions, histochemical tests were performed for assessing the efficiency of the promoter in controlling the gene *uidA* expression in the presence of different chemical compounds. According to results, we found the effect of ethanol and cycloheximide in the induction of the *atrC* promoter on roots. Induction using ethanol was also found in the qPCR experiments.

Key-words: The *atrC* promoter. Sugarcane. *Setaria viridis*.

LISATA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da parede celular da cana-de-açúcar: celulose, hemicelulose, pectina e lignina, importantes na produção de etanol de segunda geração.....	16
Figura 2	Representação do glucuronoarabinoxilano, que possui ligação α e β	18
Figura 3	Northern blot: Nível de expressão dos gene <i>atrC</i> , <i>atrD</i> e <i>actina</i> em <i>A. nidulans</i> cultivado na presença de diferentes compostos tóxicos: 1 controle (DMSO 0,1%), 2 reserpina (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 3 sulfometuron metil (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 4 controle (etanol 0,1%), 5 imazalil (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 6 fenarimol (20 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 7 pisatin (15 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 8 ciclo-heximida (1%)	23
Figura 4	Vetor p6N-o <i>GUSi</i> com os promotores: A) <i>atrC</i> full; B) <i>atrC</i> short. hptII: agente de seleção para higromicina, Sm/Sp: agente de seleção para estreptomicina/spectinomicina, o <i>GUSi</i> : gene repórter <i>GUS</i> com íntron. Tnos: região terminadora.....	28
Figura 5	1 Vetor de clonagem p6N-o <i>GUSi</i> . hptII: gene que confere resistência à higromicina; Sm/Sp: gene que confere resistência à estreptomicina/spectinomicina; <i>GUS</i> : gene repórter. Tnos: Região terminadora. 2 Representação esquemática do vetor de clonagem com os promotores fusionados ao <i>GUS</i>	29
Figura 6	Vetor p7UG-AB, que foi utilizado como controle positivo. Sm/Sp: agente seletivo para estreptomicina/spectinomicina; <i>Gus</i> : gene repórter.....	30

- Figura 7 Sequência do promotor *atrC* full analisada no programa *PlantCare*. Em laranja sequência retirada para *atrC*-short (1162pb), em marrom elemento *cis* em resposta à luz, rosa: elemento *cis* em resposta à baixa temperatura, amarelo: elemento *cis* em resposta ao ácido salicílico, azul: elemento *cis* regulador da expressão do endosperma, vermelho: elemento *cis* regulador da expressão do endosperma, verde: TATA Box, cinza: CAAT Box 45
- Figura 8 Gel de agarose 0,8%, PCR para confirmar transformação dos vetores em *E. coli*. M: marcador de baixo peso molecular; C+:vetor original *atrC*, 309-1: vetor com promotor *atrC* full; 309-2: vetor com promotor *atrC* full; 309-3: vetor com promotor *atrC* full; 310-1: vetor com promotor *atrC* short; 310-2: vetor com promotor *atrC* short; 310-3: vetor com promotor *atrC* short ... 46
- Figura 9 Gel de agarose 8%. Resultado de digestão enzimática com a enzima de restrição *PvuII*. Verde: Digestão DNA do vetor *atrC* full em bandas de 666pb, 3800pb, 9949pb. Azul: Digestão DNA do vetor *atrC* short em bandas de 666pb, 3519pb, 9949pb 47
- Figura 10 Gel de agarose 0,8%. PCR de colônia para confirmar transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as construções dos promotores *atrC* e *atrD*. C-: água; C+: vetor original *atrC*; 309: vetor com promotor *atrC* full; 310: vetor com promotor *atrC* short..... 48
- Figura 11 Esquema do processo de cultura de tecidos e transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizado em *Setaria viridis*. O processo compreende desde a indução de calos até a aclimação das plantas regeneradas 49

Figura 12 Ilustração esquemática das etapas do processo de aclimação de plantas transgênicas de <i>S. viridis</i>	50
Figura 13 Gel de agarose 0,8%. PCR com par de primer oGUSi de amplicon 424 pb dos perfilhos do primeiro evento. M: Marcador de alto peso molecular; 1-20 DNA de perfilhos transformados com o promotor <i>atrC</i> full. C+: DNA de planta <i>Setaria viridis</i> transformada com <i>GUS</i> intron; P: plasmídeo com promotor <i>atrC</i> full; C-: planta não transformada.....	51
Figura 14 Folhas transformadas com <i>atrC</i> full::oGUSi pulverizadas com etanol 10% e coletadas e imersas em solução GUS por 24 horas. As coletas foram realizadas nos tempos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas	52
Figura 15 Teste histoquímico de plantas não transformadas induzidas com etanol 0,1% por 12 horas. Coletas da ponta, meio e base da folha, caule apical, caule basal e raiz foram colocadas por 24 horas em solução X-gluc com pH 4,5, 6,0 e 7,0	56
Figura 16 Raízes de <i>Setaria viridis</i> induzidas com água, ciclo-hexamida 1%, etanol 0,1%, etanol 1,0%, etanol 2,5% em tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas	58
Figura 17 Resultado qPCR de <i>Setaria viridis</i> em presença de compostos químicos (par primer oGUSi F1/R1): S 1 zero hora, S 3 ciclo-hexamida 1%, S 4 etanol 0,1%, S 5 etanol 1%, S 7 água, S 8 ciclo-hexamida 1%, S 9 etanol 0,1%, S 10 etanol 1%, S 11 etanol 2,5%, WT way type.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	A cana-de-açúcar	14
2.1.1	Parede celular de cana-de-açúcar	15
2.1.2	Etanol de segunda geração.....	17
2.1.3	Transformação genética em cana-de-açúcar.....	19
2.2	A região promotora	20
2.2.1	Promotor <i>atrC</i> (ABC transporter)	22
2.3	Planta modelo: <i>Setaria viridis</i>	23
2.4	Transformação genética de plantas com <i>A. tumefaciens</i>	24
3	OBJETIVO GERAL	26
3.1	Objetivos específicos.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Desenho e construção dos vetores	27
4.2	Transformação em <i>Escherichia coli</i>	30
4.2.1	Crescimento de bactérias	30
4.2.2	Células competentes de <i>Escherichia coli</i>	31
4.2.3	Transformação de <i>Escherichia coli</i>	32
4.2.4	Isolamento plasmidial em pequena escala.....	32
4.2.5	Reação de PCR	33
4.2.6	Digestão enzimática	34
4.3	Transfecção em <i>A. tumefaciens</i>	34
4.3.1	Células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	34
4.3.2	Transfecção de <i>A. tumefaciens</i> por choque térmico	35
4.3.3	PCR de colônia.....	35
4.4	Transformação de plantas via <i>A. tumefaciens</i>	36
4.4.1	Explante de <i>S. viridis</i>	36
4.4.2	Transformação de <i>S. viridis</i> via <i>A. tumefaciens</i>	36
4.4.3	Cultura de tecidos.....	37
4.4.4	Processo de cultura de tecidos <i>S. viridis</i>	38
4.5	Extração de DNA	38
4.6	Reação de PCR	39
4.7	Ensaio para atividade GUS	40
4.7.1	Pulverização e alta concentração de etanol	40
4.7.2	Ação endógena	40
4.7.3	Diferentes compostos	40
4.8	Teste histoquímico	41
4.9	Extração de RNA total	41
4.10	Tratamento com DNase.....	42

4.11	Transcriptase reversa (cDNA).....	42
4.12	qPCR.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Desenho e construção de vetores	44
5.2	Transformação em <i>Escherichia coli</i>	46
5.3	Transfecção em <i>A. tumefaciens</i>	47
5.4	Transformação de plantas via <i>A.tumefaciens</i>	48
5.5	Bioensaio com pulverização e alta concentração de etanol.....	51
5.6	Bioensaio com adição de etanol em meio líquido e baixa concentração de etanol	54
5.6.1	Bioensaio de atividade endógena de <i>GUS</i> em <i>S. viridis</i>	54
5.7	Bioensaios com imersão das raízes dos perfilhos em meio líquido e adição de compostos químicos	57
5.8	qPCR.....	58
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea que pertence ao gênero *Saccharum*. Teve origem no Sudeste Asiático há cerca de 6000 a.C. A partir de então, a cana-de-açúcar vem se dispersando pelo mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (BRANDÃO, 2010).

O Brasil, além de ser o maior produtor de cana-de-açúcar, é também o maior produtor de açúcar e etanol e se mantém em expansão no mercado externo devido à utilização do biocombustível como alternativa energética (BRASIL, 2014).

A cultura da cana-de-açúcar é direcionada principalmente para a produção de etanol e açúcar, sendo o bagaço utilizado na geração de energia elétrica (GOLDEMBERG, 2008). Como a cana-de-açúcar tem como característica acumular sacarose em seus colmos, esta é uma matéria prima importante na produção de etanol. Mas o bagaço está tendo destaque no setor energético, pois é uma fonte de energia fermentável, o que possibilita a produção de bioetanol (BRANDÃO, 2010).

Atualmente a produção de etanol lignocelulósico é inviável por necessitar de ácidos para degradar a parede celular da cana-de-açúcar. O desenvolvimento de métodos alternativos para aumentar a eficiência dessa degradação é meta prioritária de pesquisas atuais neste tema. Com tal finalidade, enzimas são alvos de pesquisa, pois converteriam a celulose e a hemicelulose em açúcares fermentáveis (ARRUDA, 2012). Outro método seria por meio de engenharia genética de plantas, objetivando o controle do processo de degradação da parede celular da cana. Neste sentido, a identificação de promotores com indução regulada em plantas é extremamente desejável para serem utilizadas neste processo.

O promotor tem como característica controlar a expressão gênica por meio de ligações entre a RNA polimerase II e sequências específicas de DNA. Desta forma, o promotor pode ser constitutivo ou regulado, em função dos elementos presentes na sua sequência nucleotídica. O promotor constitutivo resulta na expressão gênica controlando determinada característica em toda a planta e de maneira contínua, o que é indesejável em alguns casos de plantas geneticamente modificadas, como por exemplo, em características que devam ser manifestadas somente em momentos específicos, como no caso da degradação da parede celular da cana-de-açúcar.

Andrade (2000) verificou que o promotor *atrC* apresenta um aumento na expressão gênica em presença de diferentes compostos, inclusive em presença de uma baixa concentração de etanol. Esse promotor foi isolado do fungo *Aspergillus nidulans* e o gene *atrC* codifica uma proteína (ATRC) pertencente à família de transportadores de membrana do tipo ABC (*ATP-Binding-Cassete transportes*), envolvidas no sistema de resistência múltipla a drogas.

Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a funcionalidade do promotor *atrC* em *Setaria viridis*, uma planta modelo para a cana-de-açúcar por ser também uma gramínea, além de apresentar ciclo de vida rápido, grande produção de sementes e boa regeneração *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae, grupo Saccharastrae, gênero *Saccharum*. O gênero *Saccharum* contém seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*. As espécies *S. spontaneum* e *S. robustum* são consideradas silvestres, enquanto as quatro outras, cultivadas. O alto nível de ploidia e de número de cromossomos caracteriza o gênero *Saccharum* e dificulta a sua classificação taxonômica (RAO, 1987).

A cultura da cana-de-açúcar teve origem no sudeste da Ásia e foi introduzida no Brasil, em 1532, na capitania de São Vicente, onde foi construído o primeiro engenho para produção de açúcar. No entanto, foi na região Nordeste que a economia do açúcar se desenvolveu (MACHADO, 2005). Inicialmente a cana-de-açúcar era utilizada na alimentação, fabricação de vinhos e medicamentos. Hoje em dia, além da produção do açúcar e de eletricidade, a cana é empregada na fabricação de álcool combustível (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2014b).

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e o segundo de etanol (UNICA, 2013). A produção de cana-de-açúcar teve aumento de 0,66% na safra 2013/2014 e 18,97% de aumento na produção de etanol até o presente momento (UNICA, 2014a).

A instabilidade no fornecimento de petróleo estimula a busca pelo uso de fontes renováveis para a produção de energia. Nesse contexto, o Brasil é beneficiado por apresentar condições favoráveis para o cultivo de espécies vegetais que podem ser utilizadas para a produção de energia renovável, com

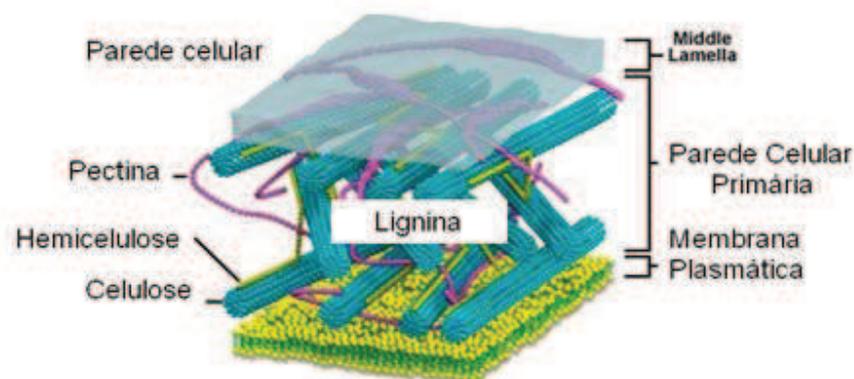
destaque para a cana-de-açúcar (BOLSA DE VALORES DE SÃO PAULO - BOVESPA, 2011).

A utilização dessa gramínea em tal processo é extremamente interessante já que toda a planta pode ser aproveitada. O caldo é fermentado para produção de etanol o bagaço é utilizado para produção de energia elétrica e a palhada é usada para recuperar a fertilidade do solo (CNI-IEL, 2008).

A cana-de-açúcar é a principal fonte para a produção de etanol lignocelulósico o que pode aumentar significativamente, e de forma sustentável, a produção de bioetanol, pois não há necessidade do aumento da área de plantio. Para isso, esforços têm sido direcionados para a produção de etanol de segunda geração a partir de cana-de-açúcar (SOCCOL et al., 2010).

2.1.1 Parede celular de cana-de-açúcar

Para melhor compreender a produção de etanol de segunda geração é importante conhecer a parede celular da cana-de-açúcar (Figura 1). A parede celular é composta por polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos consistem em celulose, hemicelulose e pectinas. Eles são formados por pelo menos 14 monossacarídeos diferentes e consistem na maior fonte de reserva de carbono fixado na fotossíntese. Assim, os polissacarídeos são uma rica fonte de biomassa para a produção de bioetanol (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).



Fonte: Internet

Figura 1 Representação da parede celular da cana-de-açúcar: celulose, hemicelulose, pectina e lignina, importantes na produção de etanol de segunda geração

Fonte: Rehagro (2014)

As moléculas de celulose se alinham paralelamente formando uma fibra, que conseqüentemente expulsa as moléculas de água. As hemiceluloses envolvem as microfibrilas formando o domínio celulose-hemicelulose. Esse domínio não impede a interação entre as fibras, compondo uma rede. As pectinas são açúcares ramificados que estabelecem a porosidade da parede. No domínio formado pelas pectinas, encontra-se imerso o domínio celulose-hemicelulose (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

A cana-de-açúcar apresenta como principal hemicelulose os glucuronoarabinoxilanos (GAXs), diferente da maioria dos vegetais que possuem o xiloglucano. No entanto, a cana possui xiloglucanos e mananos em menor quantidade. Os β -glucanos são encontrados em alta proporção em todos os tecidos de cana (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010; SILVA, 2005).

A lignina é o último componente a ser incorporado na parede, quando ocorre o desenvolvimento das células. Ela penetra nas fibrilas causando rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos. As ligações são

responsáveis pela forte e rígida natureza da molécula da celulose na estrutura da fibra vegetal (FENGEL; WEGENER, 1991; MESHITSUKA; LSOGAI, 1996).

Segundo Soccol et al. (2010), criar uma etapa biológica na qual a expressão de genes induza a degradação da parede celular da própria planta facilitaria a manipulação na indústria para a produção de etanol. Dessa forma, a biomassa estaria disponível para posteriores processos de produção, o que levaria a uma redução de custo.

Com o propósito de utilizar material lignocelulósico e aumentar a disponibilização de biomassa, técnicas e processos para facilitar a separação da lignina estão sendo criados a partir de utilização de ácidos (LONG et al., 2013).

2.1.2 Etanol de segunda geração

O caldo armazena apenas 1/3 do potencial energético da cana-de-açúcar, sendo que os outros 2/3 estão na biomassa. O bagaço, que é obtido a partir da extração do caldo, tem sido utilizado para gerar eletricidade em usinas. Mas, atualmente, o objetivo maior é utilizá-lo para produzir etanol lignocelulósico (SOCCOL et al., 2010).

A produção de etanol de segunda geração baseia-se na solubilização da parede celular e disponibilização dos seus polissacarídeos constituintes. Para tanto é utilizado um processo de hidrólise ácida constituído das seguintes etapas: pré-tratamento com ácidos, hidrólise enzimática e fermentação. O que torna o processo economicamente inviável para a produção comercial de etanol, pois a utilização de ácidos é um método caro (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

No pré-tratamento, ocorre à quebra da estrutura da lignina, o rompimento da estrutura da celulose e aumento da porosidade do material lignocelulósico. Para isso são utilizados ácidos fortes como: ácido sulfúrico,

ácido clorídrico e ácido trifluoroacético. Como consequência os constituintes da parede celular ficam mais disponíveis para quebra enzimática e fermentação. Os ácidos sulfúrico e clorídrico agem sobre a celulose e a hemicelulose, já o ácido trifluoroacético rompe principalmente as ligações alfa nas ramificações das hemiceluloses (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

Na hidrólise enzimática, as ligações do tipo α dos glucuroarabinosilanos são as primeiras a serem quebradas seguidas das ligações β (FIGURA 2). A celulose é a última a ser quebrada, pois apresenta forte interação intermolecular, ausência de água e as fibrilas estão envolvidas por hemicelulose. O problema da hidrólise de polissacarídeos com ligações α e β é a diferença de tempo para a quebra, pois os monossacarídeos que foram gerados inicialmente podem levar à formação de furfurais, substâncias tóxicas para a fermentação (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010).

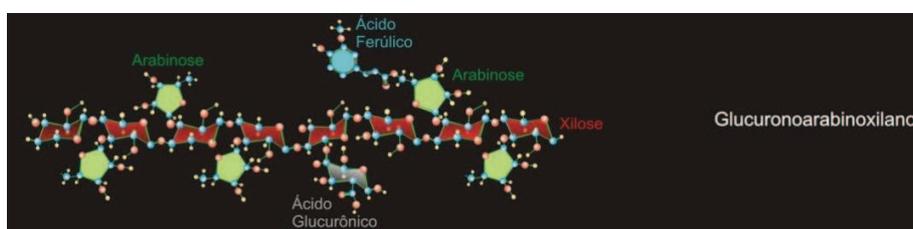


Figura 2 Representação do glucuroarabinosilano, que possui ligação α e β
Fonte: EBAH (2014)

A hidrólise enzimática produz hexoses e pentoses que serão fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae*, único fungo utilizado para o processo de fermentação na produção de etanol, mas esse é capaz de fermentar apenas substratos que contém hexoses. Para aprimorar o processo de fermentação, pesquisas estão sendo desenvolvidas para se gerar microrganismos aptos a fermentar ambos os compostos (SOCCOL et al., 2010).

Outra maneira de se reduzir gastos na produção de etanol lignocelulósico seria induzir a própria planta a degradar a parede celular disponibilizando os polissacarídeos antes do processamento pela indústria (SOCCOL et al., 2010).

2.1.3 Transformação genética em cana-de-açúcar

A engenharia genética possibilita obter organismos com fragmentos de DNA exógenos de interesse, sendo que estes podem ser oriundos de espécies relacionadas ou de organismos de outros reinos (GANDER; MARCELLINO, 1997; SANTARÉM, 2000). A transformação genética de plantas tem como principais objetivos executar estudos funcionais de genes e auxiliar o melhoramento genético de espécies cultivadas. Várias culturas apresentam resultado positivo para essa tecnologia, inclusive a cana-de-açúcar (ARRUDA, 2012).

A cana-de-açúcar tem sido fortemente estudada para desenvolver cultivares que apresentem maior produtividade com a finalidade de garantir a sustentabilidade da produção mundial de açúcar e etanol (WACLAWSKY et al., 2010).

Vários centros de pesquisas estão trabalhando para aprimorar a utilização da cana-de-açúcar na produção de etanol de segunda geração. Genes que codificam enzimas que catalisam a conversão de sacarose em polímeros de açúcar ou dissacarídeos, aumentando assim o teor de açúcar na cana, já são estudados. Plantas de cana modificadas geneticamente para produzir mais enzimas que degradam a celulose também são alvos para a produção de etanol lignocelulósico (CASTRO; PEREIRA, 2010).

Enzimas eficientes para degradar os polímeros da parede celular da cana em açúcares fermentáveis são necessárias para a produção de etanol

lignocelulósico, portanto, o desenvolvimento de novas rotas de bioconversão para a planta como matéria-prima em açúcares simples, juntamente com estratégias para a produção de enzimas de alto rendimento, são os principais focos na área de pesquisa de biocombustíveis atualmente (GONÇALVES et al., 2012).

A introdução de genes que induza a planta a produzir enzimas que desmontam a parede celular em um estágio específico de desenvolvimento é vantajosa, pois o crescimento da planta transgênica requer menos energia do que a produção dessas enzimas em microrganismos, como por exemplo, as xilanases de *Aspergillus* (ESCOBAR, 2010; RIZZATI et al., 2008).

2.2 A região promotora

Um gene é constituído por uma região promotora, região codificadora e terminadora. O promotor é o processador central da regulação de um gene, contém os sítios para a ligação de fatores de transcrição (TFs) e da RNA polimerase II, responsáveis pela transcrição gênica (BRANDALISE, 2007; LEWIN, 2009). O promotor possui uma região denominada “núcleo promotor” que se localiza próxima ao sítio da transcrição.

O núcleo promotor tem como característica ser a região mínima de DNA necessária para o início da transcrição. Nele se encontram elementos conservados como o TATA Box, o Inr (iniciador), o elemento de reconhecimento ao TFIIB, o CAAT Box e GC Box (BUTLER; KADONAGA, 2002; JUVEN-GERSHON; KADONAGA, 2010). Além desses sítios de ligação, os promotores apresentam vários outros sítios para transcritos específicos que são ativados por estímulos endógenos ou exógenos proporcionando a ativação ou a repressão da expressão gênica e são chamados de elementos *cis* (BRANDALISE, 2007).

A relação do núcleo promotor e dos elementos *cis* define um alto grau de controle transcricional e deve ser estudada em conjunto, para se analisar sua especificidade (BUTLER; KADONAGA, 2002; JUVEN-GERSHON; KADONAGA, 2010).

Na maioria das vezes em que a transcrição ocorre somente por embasamento no núcleo promotor, o resultado é a baixa taxa de expressão. Assim, para se alcançar altas taxas transcricionais há a necessidade de ligação de sequências específicas de DNA a sítios dos elementos *cis* (BRANDALISE, 2007).

O promotor de um gene é fundamental na biotecnologia e engenharia genética, pois é esta sequência de DNA que determina se a expressão gênica de interesse é constitutiva ou regulada. Atualmente os promotores constitutivos mais utilizados em plantas transgênicas (dicotiledôneas) são o 35S do vírus do mosaico da couve-flor, os promotores dos genes da *nopalina sintase* e *octopina sintase* de *Agrobacterium tumefaciens* e o promotor do gene que codifica a ubiquitina (*Ubi-1*) de milho (monocotiledôneas) (GREEN et al., 2002; ZHENG; MURAI, 1997).

O uso de promotores constitutivos na engenharia de plantas nem sempre é desejado, pois há características que devem ser expressas em momentos específicos. Neste caso, promotores regulados são mais eficientes. É de conhecimento, que regiões promotoras de genes induzidos apresentam *cis* elementos regulatórios, relacionados à expressão em resposta a vários fatores endógenos e exógenos. Assim, pesquisas precisas de *cis* elementos regulatórios e seus fatores de transcrição podem oferecer conhecimento dos sistemas regulatórios de genes que respondem a diferentes estímulos (ROSADO, 2012). A pesquisa por promotores induzíveis é fundamental para o melhoramento genético, podendo este ser utilizado em grandes culturas e para várias características, inclusive no caso dos genes relacionados à degradação da parede

celular da cana, o que diminuiria o gasto na produção de etanol de segunda geração.

2.2.1 Promotor *atrC* (ABC transporter)

Estudos pioneiros da função dos transportes ABC (*ATP-Binding-Cassete*) foram realizados com o fungo *A. nidulans* (ANDRADE, 2000), concluindo-se que essas proteínas compõem um mecanismo de proteção celular a compostos tóxicos. Isso também se aplica aos patógenos de planta (DE WAARD et al., 2006; YAZAKI, 2006).

Os dois primeiros genes isolados e relacionados ao transporte ABC em fungos filamentosos foram o *atrA* e *atrB* (*ABC transporter*), ambos apresentando similaridade com proteínas relacionadas a transportadores ABC em *S. cerevisiae*. Dois outros genes também foram identificados, *atrC* e *atrD* (ANGERMAYR et al., 1999; ANDRADE et al., 2000).

Em estudos anteriores, Andrade (2000) verificou que o gene *atrC* apresentava um nível de expressão basal, mas essa era aumentada com a presença de compostos químicos, e até mesmo na presença de uma baixa concentração de etanol (Figura 3).

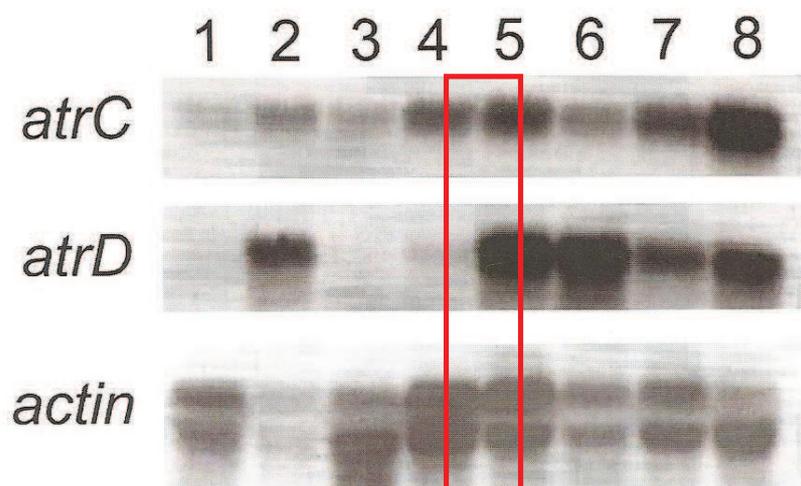


Figura 3 Northern blot: Nível de expressão dos gene *atrC*, *atrD* e *actina* em *A. nidulans* cultivado na presença de diferentes compostos tóxicos: 1 controle (DMSO 0,1%), 2 reserpina (100 µg ml⁻¹), 3 sulfometuron metil (30 µg ml⁻¹), 4 controle (etanol 0,1%), 5 imazalil (10 µg ml⁻¹), 6 fenarimol (20 µg ml⁻¹), 7 pisatin (15 µg ml⁻¹), 8 ciclo-heximida (1%)

Fonte: Andrade (2000).

Neste trabalho, foi selecionado o promotor do gene *atrC*, pois este apresentou indução por etanol, mesmo a uma baixa concentração (Figura 3) como observado por Andrade (2000).

2.3 Planta modelo: *Setaria viridis*

Plantas modelo são extremamente úteis para a avaliação de transgenes de interesse antes de introduzi-los em culturas alvo. Isso se dá principalmente devido ao tempo de geração, eficiência dos protocolos de transformação e espaço requerido para a reprodução de plantas transgênicas cultivadas.

S. viridis é uma Paniceae, diploide, gramínea de metabolismo C4 com genoma de 510 Mb, baixa estatura, ciclo de vida rápido, prolífica produção de

sementes e pode ser transformada via *A. tumefaciens*. Além disso, apresenta morfologia semelhante à maioria das gramíneas Andropogoneae, incluindo as principais matérias-primas para biocombustíveis (LI; BRUTNELL, 2011), inclusive a cana-de-açúcar.

As plantas de metabolismo C4 de maior interesse agrônômico incluem o milho, sorgo e cana-de-açúcar, porém são de grande estatura, e possuem tempos relativamente longos de geração, muitas vezes de vários meses. Assim, existe a necessidade da utilização de uma planta modelo para agilizar a análise de transgenes de interesse antes de iniciar um processo de transformação em cana-de-açúcar, uma vez que a planta modelo possui um ciclo de vida rápido, pequeno porte, entre outras características desejáveis (BROWN; PARSLEY; HIBBERD, 2005).

2.4 Transformação genética de plantas com *A. tumefaciens*

Uma técnica utilizada na engenharia genética de plantas é a transformação por *Agrobacterium*. Ela apresenta melhor resultado em dicotiledôneas, mas já há resultados positivos em transformações com monocotiledôneas (CARNEIRO et al., 2009). Ho e Vasil (1983) obtiveram cana-de-açúcar transformada via *A. tumefaciens* resistente a herbicida, certificando a eficiência do método de transferência gênica em monocotiledôneas.

A *A. tumefaciens* possui um plasmídeo chamado de plasmídeo Ti (indutor de tumor), que confere a capacidade natural de transferir uma parte de seu DNA para a célula vegetal que está infectando, induzindo a formação de um tumor conhecido como galha-da-coroa (CHILTON et al., 1982).

A manipulação genética do plasmídeo Ti possibilitou a substituição das sequências nativas na região de transferência do plasmídeo (T-DNA) por genes de interesse. Assim, quando a *Agrobacterium* contendo um plasmídeo Ti

manipulado infecta uma célula vegetal, esta transfere o gene de interesse para dentro da célula transformada e que se insere posteriormente ao DNA da planta (CHILTON et al., 1982; HERRERA-ESTRELLA et al., 1993).

Antioxidantes são adicionados ao meio de co-cultivo, assim como o uso de calos embriogênicos ou os ferimentos do tecido-alvo são fatores que aumentam a infecção por *Agrobacterium*, pois diminuem barreiras para a inserção do T-DNA (GODWIN; FORD-LLOYD; NEWBURY, 1992; SONGSTAD; SOMERS; GRIESBACH, 1995).

Um fator importante para a transformação genética é a capacidade de regeneração do tecido transformado. Após o processo de transformação, a característica pode ser transferida convencionalmente (DRAPER et al., 1988).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a funcionalidade do promotor do gene *AnatrC* de *A. nidulans* na planta modelo *S. viridis*

3.1 Objetivos específicos

- a) Estabelecer calos embriogênicos de *S. viridis* para a etapa de transformação genética;
- b) Gerar eventos transgênicos de *S. viridis* via *A. tumefaciens* com o cassete de expressão contendo o promotor do gene *atrC*;
- c) Regenerar eventos transgênicos de *S. viridis* para as etapas de caracterização molecular;
- d) Verificar a integração do T-DNA nos indivíduos regenerados via PCR;
- e) Avaliar via teste histoquímico a expressão do gene repórter *uidA* sob controle do promotor *atrC* em plantas transformadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho e construção dos vetores

Para o presente trabalho, as sequências dos promotores *atrC* full e *atrC* short (Figura 4) foram sintetizados pela DNA CloningService, na Alemanha e introduzidos no vetor de clonagem p6N-GUSi (Figura 5). Esse vetor possui dois pontos de origem de replicação, podendo ser clonado em *E.coli* e *Agrobacterium*. Além disso, ele possui um gene que confere resistência à higromicina, sendo esse, o antibiótico que foi usado na cultura de tecidos como agente seletivo para plantas; um gene que confere resistência à estreptomicina e spectinomicina, antibióticos utilizados para seleção bacteriana. Todos os promotores foram fusionados ao gene *GUSi*. O vetor de clonagem p6N-o*GUSi* (*GUS* otimizado) foi utilizado como controle negativo no experimento de transformação genética em *S. viridis*.

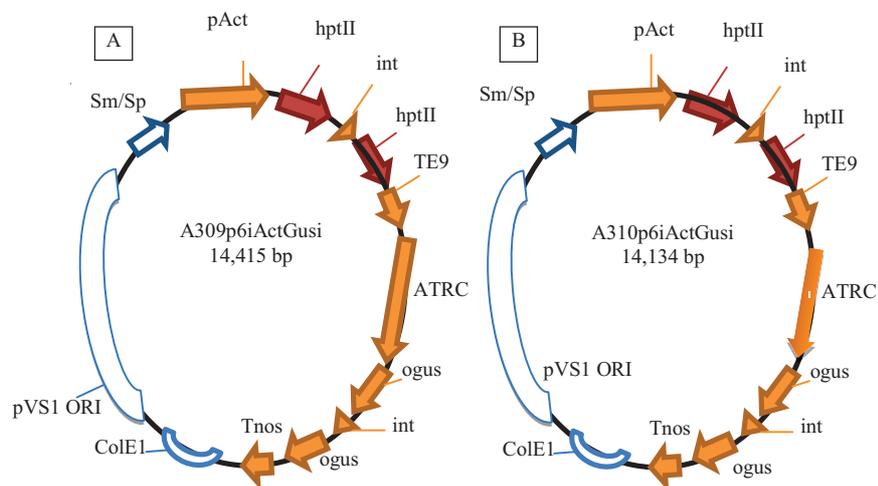


Figura 4 Vetor p6N-o*GUSi* com os promotores: A) *atrC* full; B) *atrC* short. hptII: agente de seleção para higromicina, Sm/Sp: agente de seleção para estreptomicina/spectinomicina, o*GUSi*: gene repórter *GUS* com íntron. Tnos: região terminadora

A sequência do promotor *atrC* full foi analisada e uma parte menor da sequência foi selecionada, formando-se a sequência *atrC* short. A sequência foi analisada com base na região que potencialmente contém os elementos *cis* regulatórios, resultando em dois vetores de análise, *atrC* full e *atrC* short (Figura 6).

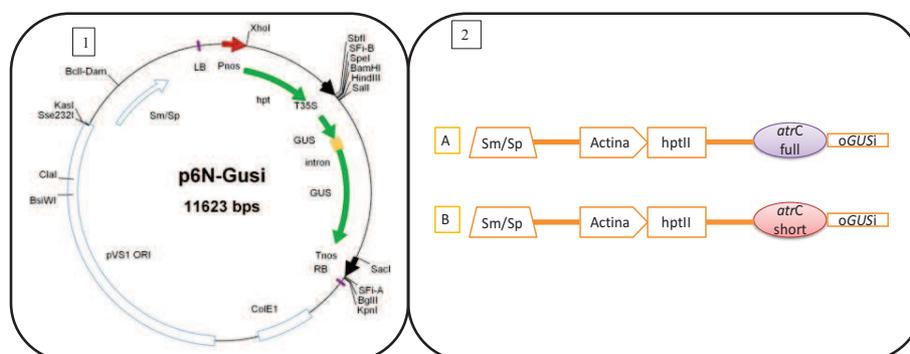


Figura 5 1 Vetor de clonagem p6N-o*GUSi*. *hptII*: gene que confere resistência à higromicina; *Sm/Sp*: gene que confere resistência à estreptomicina/spectinomicina; *GUS*: gene repórter. Tnos: Região terminadora. 2 Representação esquemática do vetor de clonagem com os promotores fusionados ao *GUS*

O controle positivo foi o p7UG-AB (FIGURA 6). Esse é um controle constitutivo devido à presença do gene *GUS* sob regulação do promotor da ubiquitina de milho. Nesse vetor, o agente seletivo é o antibiótico glufosinato de amônio para cultura de tecidos e estreptomicina/spectinomicina para bactérias. Como o experimento necessitava de um controle positivo e não havia um promotor constitutivo no mesmo vetor que os promotores e o controle negativo, o p7UG-AB foi utilizado.

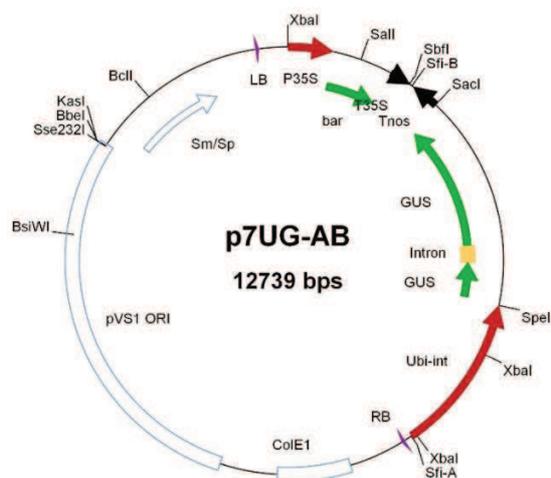


Figura 6 Vetor p7UG-AB, que foi utilizado como controle positivo. Sm/Sp: agente seletivo para estreptomicina/spectinomicina; *Gus*: gene repórter

4.2 Transformação em *Escherichia coli*

Com o objetivo de multiplicar o DNA das construções em estudo, inseriram-se os vetores *atrC* full e *atrC* short em *E. coli*. Para isso, foi essencial a produção de células competentes de *E. coli*, transfecção em *E. coli* e averiguação da integridade do material transformado, todas essas etapas foram realizadas conforme protocolos descritos abaixo.

4.2.1 Crescimento de bactérias

O meio de cultura utilizado para crescimento bacteriano de *E. coli* foi o LB (Luria Broth) que é constituído de cloreto de sódio (10 g/L), triptona (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L). O ágar 1,6% (p/v) foi utilizado para solidificação do meio LB. Este é aferido ao pH de 7,5 antes de ser autoclavado

por 20 minutos a 121 °C. Como agente seletivo, utilizou-se o antibiótico estreptomicina em uma concentração de 12,5 mg/mL.

O meio de cultura para crescimento da *A. tumefaciens* foi o YEB que é composto de extrato de carne (5 g/L), extrato de levedura (1 g/L), peptona (5 g/L), sacarose (5 g/L) e MgSO₄ (240 mg/L). Para solidificação do meio, acrescentou-se 1,6% de ágar (p/v). A faixa de pH ótimo para um bom crescimento da bactéria é de 6,8.

4.2.2 Células competentes de *Escherichia coli*

No processo de produção de células quimiocompetentes de *E. coli*, utilizou-se o meio SOB que leva triptona (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (0,6 g/L), cloreto de magnésio (10 mL/L) e sulfato de magnésio (10 mL/L) em um pH ótimo de 7,0. O tampão 1 é cloreto de sódio (14,7 g/L) e o tampão 2 tem a mesma constituição do tampão 1 acrescido de glicerol 15%.

A cepa bacteriana, XL10 Gold, foi estriada com o auxílio de uma alça de platina em placa contendo meio LB e incubada por 16 horas, a 37 °C. Uma colônia foi transferida para 10 mL de meio LB líquido com estreptomicina (12,5 mg/mL) e incubada por 16 horas, a 37 °C, sob agitação de 300 rpm em agitador orbital (Tecnal TE-421). Após a incubação, uma alíquota de 5 mL foi transferida para 250 mL de meio SOB e incubado novamente a 37 °C, sob agitação de 300 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,4. A cultura foi resfriada em gelo por 15 minutos, transferida para tubo de 50 mL (congelado) e centrifugada a 3.300 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL do tampão 1. Em seguida, os volumes de dois tubos *falcon* foram unidos e o volume final foi acertado para 16 mL com tampão 1. A cultura foi incubada em gelo por 15 minutos e, em seguida, centrifugada a 3.300 g/5 minutos/4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e a cultura ressuspensa em 2 mL do

tampão 2. O volume final foi distribuído em alíquotas de 100 μ L em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 °C.

4.2.3 Transformação de *Escherichia coli*

Para a transformação de *Escherichia coli*, foi utilizado o meio SOC para crescimento bacteriano durante o processo de transformação. Esse é composto de triptona (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (500 mg/L), KCl (250 mM), $MgCl_2$ (2 M), $MgSO_4$ (2 M) e glicose (1 M) em pH 7,0.

Uma alíquota de células competentes anteriormente preparadas foi utilizada para cada transformação. As células competentes foram retiradas do ultrafreezer e deixadas no gelo por 10 minutos para descongelar. Cerca de 10 mg de DNA plasmidial foi adicionado e a cultura incubada em gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram submetidas a choque térmico por 1 minuto a 42 °C logo depois, por 2 minutos no gelo. Foram adicionados 800 μ L de meio SOC e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação de 300 rpm. Uma alíquota de 50 μ L da suspensão foi plaqueada em meio LB sólido contendo 12,5 mg/mL de estreptomicina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

4.2.4 Isolamento plasmidial em pequena escala

Na extração plasmidial foram utilizadas três soluções, a solução I apresenta glicose (50 mM), tris-HCl (1 M, pH 8,0), EDTA (500 mM, pH 8,0). A solução II foi preparada no dia em que foi realizada a extração e é composta por NaOH (2 N) e SDS (10%). A solução III composta por acetato de potássio 3 M e ácido acético 2 M, pH 5,0.

Uma colônia bacteriana foi inoculada em 2,5 mL de meio LB com 12,5 mg/mL de estreptomicina e incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação de 300

rpm. Cerca de 1,5 mL da cultura foi transferido para *ependorf* de 1,5 mL e centrifugado a 16.100 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e cerca de 100 µL da solução I foram adicionados ao *pellet*. A ressuspensão foi realizada em vórtex e 1 µL de RNaseA adicionado à suspensão que foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos.

Em seguida, 250 µL da solução II foram adicionados, misturados por inversão. Após a mistura, adicionou-se 200 µL da solução III, a suspensão foi novamente misturada por inversão e incubada em gelo por 10 minutos. Após esse tempo, a cultura foi novamente centrifugada a 16.100 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 mL de isopropanol foi adicionado. A mistura foi centrifugada novamente a 16.100 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante novamente foi descartado. O *pellet* foi lavado em etanol 70%, incubado em banho seco por 10 minutos, e após seco, ressuspendido em 50 µL de água.

4.2.5 Reação de PCR

Reações de PCR utilizando-se um par de *primers* que amplificam o gene *GUS*: GUS-F GCACTAGCGGGACTTTGCAA e GUS-R CGCGAAGCGGGTAGATATCA com *amplicon* esperado de 120 pb, foram realizadas. A reação composta de DNA *template* (0,2 µg), *primer* GUS F/R (1 µM cada), dNTP (200 µM), MgCl₂ (1 mM), 10x Taq buffer, Taq DNA pol (5 u/µL), H₂O miliQ. As condições de ciclagem foram: 4 minutos a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C. A extensão final foi realizada por 5 minutos. Os produtos das reações foram avaliados em gel de agarose 1%.

4.2.6 Digestão enzimática

A digestão com a enzima *PvuII* também foi utilizada como estratégia para confirmar a identidade das sequências clonadas. Para as reações de digestão enzimática foram utilizados 1 U de enzima *PvuII*, tampão (10 x), BSA, *template* (1 µg) e H₂O. A reação foi incubada a 37 °C *overnight*. Após a reação, alíquotas foram analisadas em gel de agarose 1%.

4.3 Transfecção em *A. tumefaciens*

A transfecção em *Agrobacterium* é importante, pois é a via de transporte do DNA de interesse para a planta, na transformação genética. Para isso, foram seguidos os passos descritos abaixo.

4.3.1 Células competentes de *A. tumefaciens*

As células competentes foram produzidas a partir do tratamento das células com CaCl₂ 20 mM (200 µL da solução CaCl₂ 1 M foi diluído em 10 mL de água destilada).

A cepa de *Agrobacterium*, EHA105, foi estriada em meio YEB e incubada a 28 °C por 16 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 3 mL de meio YEB contendo 100 mg/L de rifampicina e incubada a 28 °C por 16 horas sob agitação de 150 rpm. Em seguida, 2 mL da cultura foram transferidos para 50 mL de meio YEB com 100 mg/L de rifampicina e incubadas novamente a 28 °C sob agitação (150 rpm) até atingir OD₆₀₀ 0,5-1,0. Atingindo a OD₆₀₀ ideal, a suspensão foi incubada no gelo por 15 minutos, transferida para tubo *falcon* de 50 mL e centrifugada a 4.000 rpm/10 minutos/4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e a cultura ressuspensa em 1 mL de CaCl₂ 20 mM contendo

glicerol 10%. O volume final foi distribuído em alíquotas de 100 μ L em tubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 °C.

4.3.2 Transfecção de *A. tumefaciens* por choque térmico

Para a transformação estável das construções p6N-GUSi, foram produzidas células competentes da linhagem EHA105 de *A. tumefaciens*. Essa linhagem tem genes de resistência à estreptomicina (origem plasmidial) e rifampicina (origem cromossômica) como agentes de seleção. Uma alíquota de célula anteriormente preparada foi utilizada para cada transfecção. Aproximadamente 1 μ g de DNA plasmidial foi adicionado a uma alíquota de células e incubada em gelo por 30 minutos. Após este período, as células foram transferidas para nitrogênio líquido até apresentarem uma coloração branca. Para ocorrer o choque térmico, as células foram submetidas à temperatura de 37 °C por 5 minutos. Foi adicionado 1 mL de YEB e as células foram incubadas por 2 horas a 28 °C. Uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em meio YEB contendo 300 mg/mL de estreptomicina e 50 mg/mL de rifampicina. Para concentrar as células, 800 μ L foi descartado após centrifugação de meio minuto. O *pellet* foi ressuspendido e uma alíquota de 100 μ L plaqueada novamente em meio YEB com 300 mg/mL de estreptomicina e 50 mg/mL de rifampicina.

4.3.3 PCR de colônia

Com o objetivo de se confirmar a transformação, foi realizada uma PCR a partir de colônias bacterianas. A partir das estrias, uma pequena alíquota foi utilizada como DNA *template*, *primers* GUS F/R (1 μ M), dNTP (200 μ M), MgCl₂ (1 mM), 10 x Taq buffer, Taq DNA pol (5 u/ μ L), H₂O miliQ. As condições de ciclagem foram as mesmas descritas acima no item 4.2.5.

4.4 Transformação de plantas via *A. tumefaciens*

Para os ensaios de transformação de plantas é essencial a obtenção de calos competentes. Os processos necessários à transformação via *Agrobacterium* estão descritos abaixo.

4.4.1 Explante de *S. viridis*

As sementes foram retiradas da palha e da casca. Estas foram desinfestadas com hipoclorito 10% e Tween 20 por 3 minutos e enxaguadas com água destilada autoclavada para serem inseridas em meio CIM para indução de calo e mantidas no escuro por 3 a 4 semanas. Após esse período, os calos embriogênicos foram selecionados, repicados em meio fresco e transformados após três dias.

4.4.2 Transformação de *S. viridis* via *A. tumefaciens*

Para cada construção, foi realizado um pré-inóculo, sendo que uma colônia de *Agrobacterium* transfetada foi transferida para 5 mL de YEB contendo 300 mg/mL de estreptomicina e 50 mg/mL de rifampicina e mantida a 28 °C por 16 horas. Após esse período, uma alíquota de 5 mL foi utilizada como inóculo em 20 mL de YEB contendo 300 mg/mL de estreptomicina e 50 mg/mL de rifampicina e mantida a 28 °C sob agitação de 150 rpm até atingir OD₆₀₀ de 0,6-0,7. Após esse período, as células foram centrifugadas por 15 minutos. O sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido com meio de infecção acrescido de acetoseringona 200 µM. Os calos foram transferidos para um novo *falcon* e imersos em 10 mL de meio de infecção, no qual foi adicionado *synperonic* na proporção 1:1. Os calos ficaram em contato com o meio de

infecção por 5 minutos sob lenta agitação. Após esse período, o meio de infecção foi retirado com o auxílio da pipeta e os calos foram vertidos em papel filtro estéril e transferidos para meio de co-cultivo. O armazenamento dos calos foi a 22 °C no escuro por três dias.

4.4.3 Cultura de tecidos

O meio utilizado na cultura de tecidos foi basicamente o MS (1.650 mg l⁻¹ NH₄NO₃, 1.900 mg l⁻¹ KNO₃, 440 mg l⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 370 mg l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 170 mg l⁻¹ KH₂PO₄, 8,6 mg l⁻¹ ZnSO₄, 6,2 mg l⁻¹ H₃BO₃, 22,3 mg l⁻¹ MnSO₄.4H₂O, 0,025 mg l⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 0,83 mg l⁻¹ KL, 0,25 mg l⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O, 0,025 mg l⁻¹ CoCl₂.6H₂O, 0,1 mg l⁻¹ tiamina-HCl, 0,5 mg l⁻¹ ácido nicotínico, 0,5 mg l⁻¹ piridoxina-HCl, 2 mg l⁻¹ glicina, 100 mg l⁻¹ mio-inositol, 27,80 mg l⁻¹ FeSO₄.7H₂O, 37,3 mg l⁻¹ Na₂EDTA.2H₂O), variando-se o antibiótico, a concentração e a presença de complemento do meio, todos foram aferidos para pH 5,7. Para a indução de calo, o meio MS foi acrescido de ácido nicotínico (0,5 mg/L), HCl piridoxina (0,5 mg/L), HCl tiamina (0,1 mg/L), d-biotina (1 mg/L), sacarose (30 g/L), myo-inositol (100 mg/L), CuSO₄ (0,6 mg/L), kinetina (0,5 mg/L), 2,4- ácido diclorofenoxiacético (2 mg/L) e phytigel (4 g/L). O meio de infecção não contém CuSO₄ (0,6 mg/L) e phytigel (4 g/L).

O meio de co-cultivo apresentava a mesma composição que o meio de indução de calo, porém acrescido da acetosseringona (200 µM). O meio para eliminação da bactéria variava apenas na presença do antibiótico timentin (150 mg/L). O meio de seleção também era formado pelos mesmos reagentes, além de timentin (150 mg/L) e higromicina (30 mg/L). O meio de regeneração possuía uma concentração menor de sacarose (20 g/L) e phytigel (2 g/L), maior concentração de kinetina (2 mg/L) e ausência de CuSO₄ e 2,4 de ácido

diclorofenoxiacético, mas mantendo os antibióticos timentin (150 mg/L) e higromicina (30 mg/L).

O meio MS, que foi utilizado para maior enraizamento antes de aclimatar, foi basicamente formado por ácido nicotínico (0,5 mg/L), HCl piridoxina (0,5 mg/L), HCl tiamina (0,1 mg/L), sacarose (30 g/L), myo-inositol (100 mg/L), phytigel (2 g/L), timentin (150 mg/L) e higromicina (30 mg/L). Todos os meios foram diluídos em água destilada e autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

4.4.4 Processo de cultura de tecidos *S. viridis*

Após três dias em que os calos estiveram no meio de co-cultivo, eles foram transferidos para o meio para eliminação de bactérias e armazenados a 25 °C, no escuro. Após uma semana os calos foram transferidos para o meio de seleção e mantidos no escuro a 25 °C. Ao passar uma semana, os calos foram transferidos para o meio de regeneração, sob foto-período de 16 horas a 25 °C. Depois de aproximadamente 20-30 dias, os calos foram transferidos para o meio MS para melhor enraizamento, sendo que aqueles que regeneraram foram aclimatados com unimix e vermiculita. As plantas foram cobertas com plástico transparente e, passados três dias, cortou-se uma extremidade do plástico, no quarto dia a outra extremidade também foi cortada, no quinto dia o plástico foi totalmente aberto em sua parte inferior, sendo retirado no sétimo dia.

4.5 Extração de DNA

Para se certificar que as plantas foram transformadas, foi realizado a extração de DNA das plantas regeneradas com CTAB. Amostras de 200 mg de tecido foliar foram pulverizadas em nitrogênio líquido e transferidas para

ependorf de 1,5 mL. Um volume com 750 μ L de CTAB e 3 μ L de β -mercaptoetanol foi adicionado ao pulverizado e vortexado. Incubou-se em banho-maria por 60 minutos a 65 °C, sendo vortexado a cada dez minutos. Após esse período, centrifugou-se por 10 minutos a 16.900 g. O sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf*. Acrescentou-se 753 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v) e vortexado por 30 segundos. O material foi novamente centrifugado por 10 minutos a 16.900 g. O sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf* e 3 μ L de RNase foi adicionado e incubado a 37 °C por 30 minutos. Passado esse tempo 450 μ L de álcool isopropílico foi adicionado, vortexado e incubado à temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, centrifugou-se por 20 minutos a 16.900 g e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500 μ L de etanol 75% gelado. Centrifugou-se por 3 minutos a 16.900 g e descartou-se o sobrenadante. O material foi colocado em banho-seco a 37 °C por 10 minutos para secar e, após esse período, foi ressuspendido com 50 μ L de água miliQ autoclavada.

4.6 Reação de PCR

A PCR foi utilizada para confirmar que as plantas estavam realmente transformadas e, para isso, o par de *primers* específico (otimizado) foi o *oGUSi*: *oGUSi*-F TTTGTTGATGTGCAGGTGGT e *oGUSi*-R CTGCCCAATCCAACATCTCT com *amplicon* esperado de 424 pb. Para realizar a reação, foi utilizado *template* (20 mg), *primer* *oGUSi* F/R (1 μ M), dNTP (200 μ M), MgCl₂ (1 mM), 10x Taq buffer, Taq DNA pol (5 u/ μ L), H₂O miliQ. As condições de ciclagem foram: 2 minutos a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C, 1 minuto a 72 °C. A extensão final foi realizada por 5 minutos.

4.7 Ensaios para atividade GUS

Para avaliar se os promotores fúngicos testados eram funcionais em planta, dois ensaios foram montados, além de um ensaio para averiguar o melhor pH da solução de GUS, uma vez que foi observada ação endógena de GUS.

4.7.1 Pulverização e alta concentração de etanol

A primeira maneira de indução foi a pulverização das plantas com etanol 10% e a coleta de folha nos tempos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a pulverização para teste histoquímico. A folha foi dividida em ponta, meio e base em cada tempo de coleta.

4.7.2 Ação endógena

Para tentar anular a ação endógena de GUS, plantas não transformadas foram induzidas com etanol 0,1% por meio direto com a raiz, uma vez que o etanol foi colocado no meio in vitro e mantido por um período de 12 horas. Passado esse tempo, foram coletados a folha, caule e raiz e testados em diferentes faixas de pH da solução de GUS (4,5; 6,0 e 7,0). A folha apical foi dividida em ponta, meio, base e o caule em caule apical e caule basal.

4.7.3 Diferentes compostos

Plantas transformadas foram induzidas por contato direto da raiz em MS acrescido de água, ciclo-hexamida 0,1%, 0,1% de etanol, 1,0% de etanol e 2,5% de etanol. A coleta para GUS foi nos períodos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas após o tratamento.

4.8 Teste histoquímico

O ensaio histoquímico permite identificar quais plantas realmente foram transformadas devido à clivagem do X-gluc resultando em coloração azul. Diferentes pontos azuis e a intensidade da coloração determinam o nível de expressão dos promotores.

A folha, caule e raiz foram incubados no tampão de reação, em um volume de 200 μ L. Para que ocorra eficiência, o material foi incubado no escuro a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, o tampão de reação foi retirado e adicionado etanol 70% para interromper a reação e retirar a clorofila, permitindo melhor visualização da coloração azul. Passada uma semana do procedimento, as amostras foram lavadas em 1 mL de água destilada e transferidas para glicerol 50%. Os tecidos foram fotografados em microscópio ZEISS PlanApo 10x.

4.9 Extração de RNA total

Para a extração de RNA, foi utilizado o tecido radicular da planta e o protocolo usado foi com o cloreto de lítio. Sendo 2,5 mL de material macerado e colocado em tubo *falcon* de 15 mL. Adicionou-se o mesmo volume de tampão de guanidina e também de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), armazenando as amostras em gelo. O material foi centrifugado a 11.000 g a 4 °C durante 30 minutos. Após este período, a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, adicionando 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M e 2,5 vezes o volume inicial de etanol 100% gelado. Assim, as amostras foram incubadas a -20 °C por 2 horas. Novamente centrifugou-se a 11.000 g a 4 °C por 30 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* posto para secagem. Sendo ressuscitado em 1 mL de água miliQ. Este foi transferido para

um *ependorf* de 1,5 mL e centrifugado 8.000g a 4 °C durante 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo *ependorf* e adicionou-se o mesmo volume de cloreto de lítio 4M e incubado a 4 °C *overnight*. Após este período, centrifugou-se a 16.900 g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 0,5 mL de água miliQ. Adicionou-se 1/10 do volume inicial de acetato de sódio 3M e 2,5 vezes o volume inicial de etanol 100%. Novamente incubaram-se as amostras por 2 horas a -20 °C e centrifugou-se a 16.900 g a 4 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 mL de etanol 70% gelado. Nova centrifugação a 16.900 g a 4 °C por 20 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. O *pellet* após secar, foi ressuspendido a 100 µL com água miliQ. O armazenamento foi a -20 °C.

4.10 Tratamento com DNase

Para cada amostra de RNA, foram utilizados 1,5 µL de RNA, 1 µL de tampão, 6,5 µL de água e 1 µL de DNase. As amostras foram submetidas a 37 °C por 30 segundos e posteriormente adicionado 1 µL de *stop solution*, em cada, condicionando-as a 65 °C por 10 segundos.

4.11 Transcriptase reversa (cDNA)

Para cada amostra, foram utilizados: 4 µL de RNA, 6,6 µL de água, 1 µL de oligo-DT e submetido a desnaturação (10 minutos a 70 °C, seguido de 5 minutos no gelo). Adicionou-se 4 µL de buffer 5x, 2,4 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP e 1 µL de RT. Incubou-se a 42 °C por 1 hora e 70 °C por 15 minutos.

4.12 qPCR

Para confirmar a transcrição e a funcionalidade do promotor, foi realizada uma reação de PCR quantitativo em tempo real (q-PCR). O primer utilizado foi o oGUSi F1/R1 (F1: 5' TTCACGATCATGCCCTCATG 3'/ R1: 5' CCGTGTTTCATCTGCCCAATC 3'). A q-PCR é uma análise quantitativa e qualitativa do material em tempo real. Para a transcrição, utilizou-se o SYBR Green Master Mix 2x (que incluiu corante SYBR Green, Taq polimerase, ROX e dNTP), Primers F/R (5 μ M) e água. Na q-PCR, o gene de referência incluído para controle foi o succinato desidrogenase (Succ-F: 5' ACAGTTCAGCGCTACGTTCT 3'/ Succ-R: 5' GTGGCTAGAGGGACGGAT 3'). A qPCR foi realizada com 1 μ L cDNA diluído 1:10.

5 RESULTADOS

5.1 Desenho e construção de vetores

A sequência do promotor fúngico *atrC* foi analisada no programa *PlantCare* (CIS-ACTING REGULATORY ELEMENT - CARE, 2014) quanto à presença de sítios de elementos *cis*. O programa analisa sequências de planta. O promotor *atrC* apresenta um elemento *cis* em resposta à baixa temperatura (5'CCGAAA3'), um elemento *cis* em resposta à luz (5'CAGACCTGGCA3'), um elemento *cis* em resposta ao ácido salicílico (5'GAGGAGAATA3') e dois elementos *cis* em resposta à expressão do endosperma (5'GTCAT3'; 5'TGAGTCA3'), além de apresentar os sítios TATA Box e CAAT Box do núcleo promotor (Figura 7).

ATRC-Full (1442 pb)

```

-1442 ACCTCGTTGATTGAGCAATCTCCTCCTTCTGAGAGGGTCCTCGTTAAGGGCACCTTGGCGACGAGCGGAG -1373
-1372 CTCAAAGTGGACGAGCAGAAATAGCCTGAGACGCTGTTGAGTAACTCAATCGCTAGCCCTGTGATTCAA -1303
-1302 AGGCTGTTTACTCGCTGGCAGTTGAACTAGCTGAACAGAGATTGCAGAGGAATCAGGTCCGACGAGAA -1233
-1232 CTCCGCTCCACTCCGTACAAGGACTCTCCATCGGAGCTATCTTGCCTCTGGGACAAGACCATAATTAAA -1163
-1162 GAATCTTAAAGGATGGAAATGCGAGTCGCCGCAFCCTATTACTTCTGCAATAGGCAATCACATGCCATTCG -1093
-1092 TCTAAGACAGTACGAGAAATGATTACGCCAATTTCAATTGACTGTGTTTACTGGTACCCCGCGTCCGCTC -1023
-1022 AGCACGAGACAGACGCCCTGTCAAGTTCAGTTGACAGCCCTCGCTCTGCTCCAACACCTAGCAGCTGCAAGGCTCT -953
-952 AGCGTGATCTGTCAAAGGGAGTGTGATATGCAAACAGCTAGACCACCATTCCGGTGAGATGGCCATCTCT -883
-882 TTGCCGAACCCAGGGTATATCAGTGCAAAGTTTGGATGCAGGCGCTGTGTATGACTTTCACAGCATCATA -813
-812 GTACTACTAGATAGTATCCCGCCACTGTGCAAAAGTGTATATACTCCGCAAGCAGGACCCACTATTGAAGG -743
-742 GTGGAAGTGTACCAGCTCAACCAGAATCCGGCCGTTGACTATATCATTGCATCTATGGGCTATTGCTTTC -673
-672 ACTTGGCTAGTGCAGCTGACGAACTTTGCCTTCTATTGTAAGGATCCGCTGACTGGGCTGAGTTGGC -603
-602 TAAAGTTCCTCGTCAGATATCCTTTAGGTGTGCTTCAAACCAACAGAGGCAAAATAACTTCCTTGCATA -533
-532 TTTTATTAGGTTCACTTGGCAATGGCCACAAGACAGTGTCTCACAGTCTGCGACGTAATTGCAATGTTG -463
-462 TCGTCGCCCCAGACTGAAAGCCTCGAGGGCGCATTTAGGGCATGTACCCCTTTGAAATACACCACCAATAA -393
-392 CCAGCTTGTCTGCTGTGCTCAAATAACCTAGAACAGACAAATCCTCACCAATTTTCGGCAATAATT -323
-322 AATAATTATTGTCTGTGAGTCAACAGCTGTATGTTGGATAGGTGTGATCCACGGAGCCCGGGGATCCGAA -253
-252 ATATCCAAGAAGCCACGGCCGTATCCTCGGATCCCGGGGCGAAATACGAACAGATTAACCTGAAACTAA -183
-182 ACCGCGTTTAGGGAGCATCTGAGACCAGACCTGGCAATAAGCTAGGCGCCCAATGCGGAGGCTCGGACC -113
-112 CTCAGTTTACCGGCTTCGGACGTGTCTACTTTAAAAAAAAGAGAGCTCTCGTTGTCCACATCTCATATGC -43
-42 TCGACCGCGGCTGTACCGTCTACCTGAAGAGAGATAGGCAGT -1

```

Figura 7 Sequência do promotor *atrC* full analisada no programa *PlantCare*. Em laranja sequência retirada para *atrC*-short (1162pb), em marrom elemento *cis* em resposta à luz, rosa: elemento *cis* em resposta à baixa temperatura, amarelo: elemento *cis* em resposta ao ácido salicílico, azul: elemento *cis* regulador da expressão do endosperma, vermelho: elemento *cis* regulador da expressão do endosperma, verde: TATA Box, cinza: CAAT Box

Os elementos *cis*, encontrados pela análise da sequência, não têm semelhança ao processo de indução pelo promotor *atrC*, podendo este não ser funcional em plantas.

O promotor *atrC* foi sintetizado pela empresa DNA CloningService e inserido em um vetor binário, a partir do uso de enzimas de restrição. Estreptomicina/spectinomomicina é o antibiótico responsável pela seleção bacteriana e higromicina fusionada a actina, o antibiótico de seleção de transformação. O promotor está fusionado ao *GUS* que apresenta um íntron com o objetivo de eliminar falsos positivos, uma vez que apenas seres eucariotos têm a capacidade de *splicing*.

5.2 Transformação em *Escherichia coli*

Para verificar a presença do vetor em *E. coli*, foi realizada reação de PCR com o par de *primers GUS* e a digestão enzimática com a enzima de restrição *PvuII*. O resultado de PCR, após análise em gel de agarose, apresentado na Figura 8, nos permite concluir que foi observado um *amplicon* de 120 pb, conforme esperado. O resultado de digestão enzimática, após análise em gel de agarose, apresentado na Figura 9, também corresponde com o perfil de bandas esperado para o vetor.

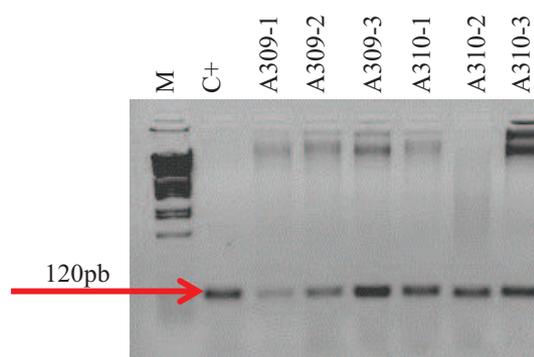


Figura 8 Gel de agarose 0,8%, PCR para confirmar transformação dos vetores em *E. coli*. M: marcador de baixo peso molecular; C+:vetor original *atrC*, 309-1: vetor com promotor *atrC* full; 309-2: vetor com promotor *atrC* full; 309-3: vetor com promotor *atrC* full; 310-1: vetor com promotor *atrC* short; 310-2: vetor com promotor *atrC* short; 310-3: vetor com promotor *atrC* short

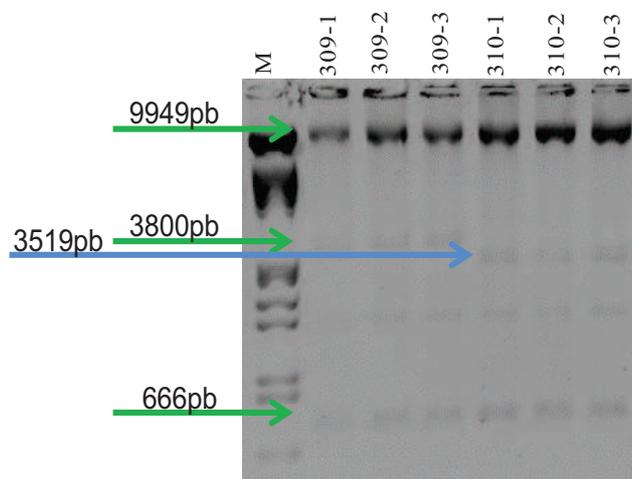


Figura 9 Gel de agarose 8%. Resultado de digestão enzimática com a enzima de restrição *PvuII*. Verde: Digestão DNA do vetor *atrC* full em bandas de 666pb, 3800pb, 9949pb. Azul: Digestão DNA do vetor *atrC* short em bandas de 666pb, 3519pb, 9949pb

Como a técnica de digestão enzimática baseia-se em uma endonuclease de restrição para cortar enzimaticamente o DNA em uma sequência específica de reconhecimento de nucleotídeos, o número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a sequência e a distribuição destes sítios de restrição (MASLOW et al., 1993).

5.3 Transfecção em *A. tumefaciens*

Com o propósito de utilizar a técnica de transformação de plantas por *Agrobacterium*, há a necessidade de primeiro, inserir o vetor de interesse nesta bactéria. Assim após a transfecção, foi realizada uma PCR de colônia com o par de *primers GUS* gerando um *amplicon* de 120 pb (Figura 10), confirmando a presença do vetor.

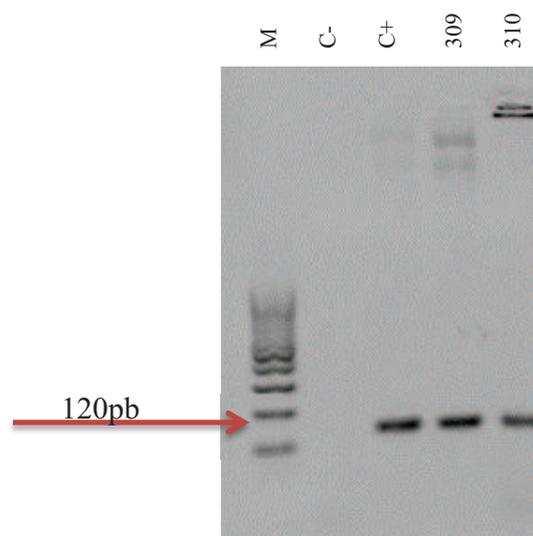


Figura 10 Gel de agarose 0,8%. PCR de colônia para confirmar transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as construções dos promotores *atrC* e *atrD*. C-: água; C+: vetor original *atrC*; 309: vetor com promotor *atrC* full; 310: vetor com promotor *atrC* short

5.4 Transformação de plantas via *A.tumefaciens*

Com a confirmação da integridade das construções, foram realizados os ensaios de transformação de *S. viridis* via *Agrobacterium*, conforme esquema apresentado na Figura 11. Eventos positivos foram observados para a construção do *atrC* full, com uma porcentagem de 7,5% de transformantes, sendo que em um total de quarenta calos, três se desenvolveram. Entretanto, para a outra construção (*atrC* short), não foram obtidas plantas regeneradas, pois nenhum calo se desenvolveu.

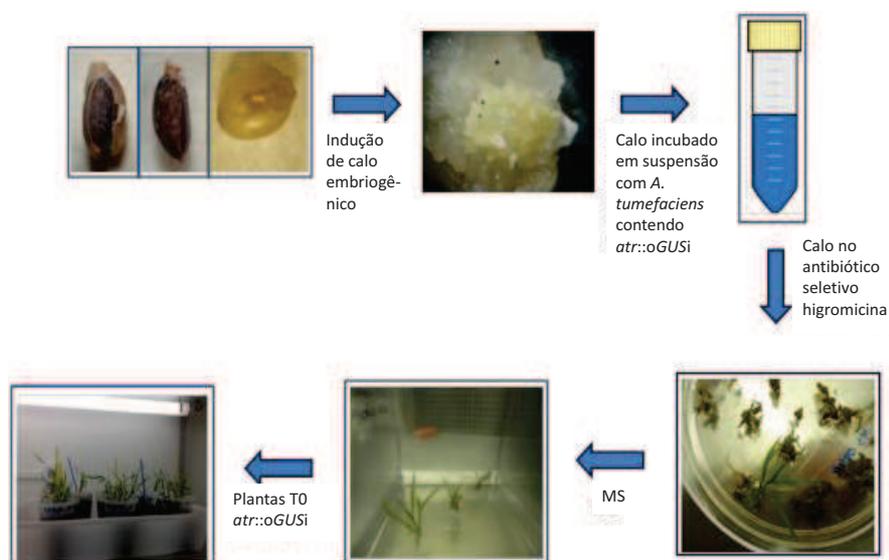


Figura 11 Esquema do processo de cultura de tecidos e transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizado em *Setaria viridis*. O processo compreende desde a indução de calos até a aclimação das plantas regeneradas

As três plântulas que foram selecionadas no meio na presença do antibiótico higromicina foram aclimatadas para análises posteriores. Sendo 230 perfilhos de um único evento, seis perfilhos de um segundo evento e três perfilhos do terceiro evento, sendo todos T0 (Figura 12).

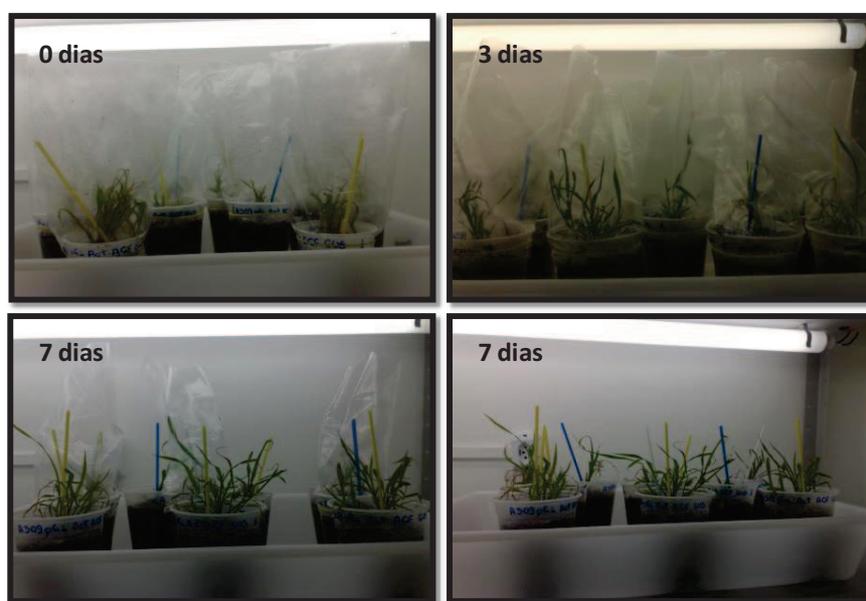


Figura 12 Ilustração esquemática das etapas do processo de aclimação de plantas transgênicas de *S. viridis*

Após o processo de aclimação, amostras foliares foram utilizadas para extração de DNA e confirmação da presença do transgene. A Figura 13 apresenta os resultados de reações de PCR, analisadas em gel de agarose, confirmando que o DNA de todos os perfilhos analisados resultou na amplificação de um fragmento de 424pb, conforme esperado.

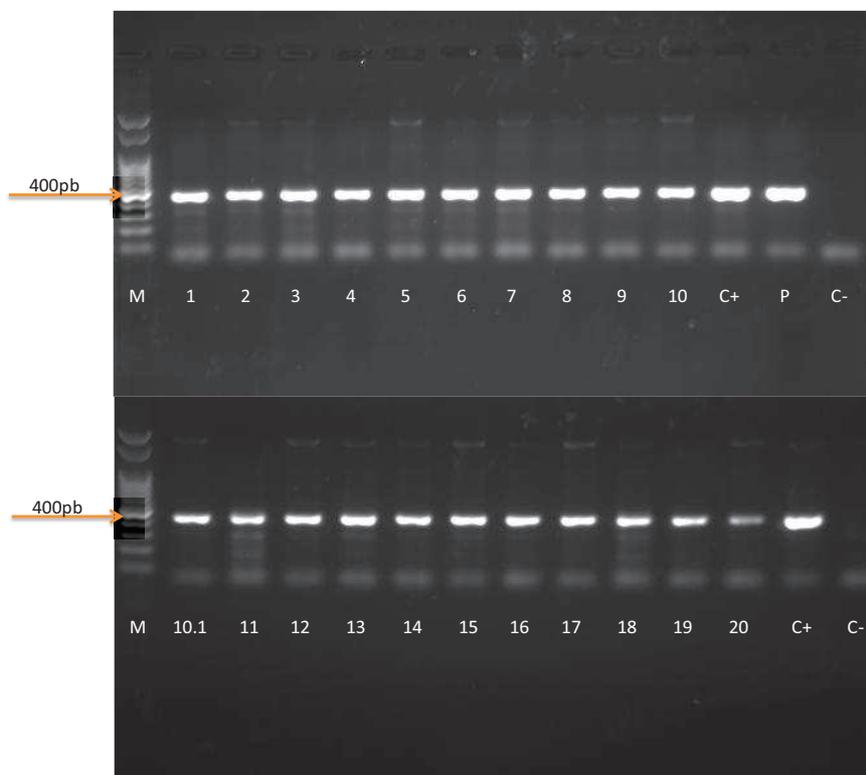


Figura 13 Gel de agarose 0,8%. PCR com par de primer o*GUS*i de *amplicon* 424 pb dos perfilhos do primeiro evento. M: Marcador de alto peso molecular; 1-20 DNA de perfilhos transformados com o promotor *atrC* full. C+: DNA de planta *Setaria viridis* transformada com *GUS* intron; P: plasmídeo com promotor *atrC* full; C-: planta não transformada

5.5 Bioensaio com pulverização e alta concentração de etanol

Com a comprovação molecular dos perfilhos transformados, um primeiro experimento para teste histoquímico foi montado. As plantas foram pulverizadas com etanol 10%. Nos períodos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas, folhas foram coletadas e colocadas em solução X-gluc para teste *GUS*. Os resultados mostraram que houve uma coloração azul restrita às bordas da ponta das folhas

nos tempos de 3 e 6 horas após a pulverização (Figura 14). O controle positivo apresentou coloração em toda a sua extensão.

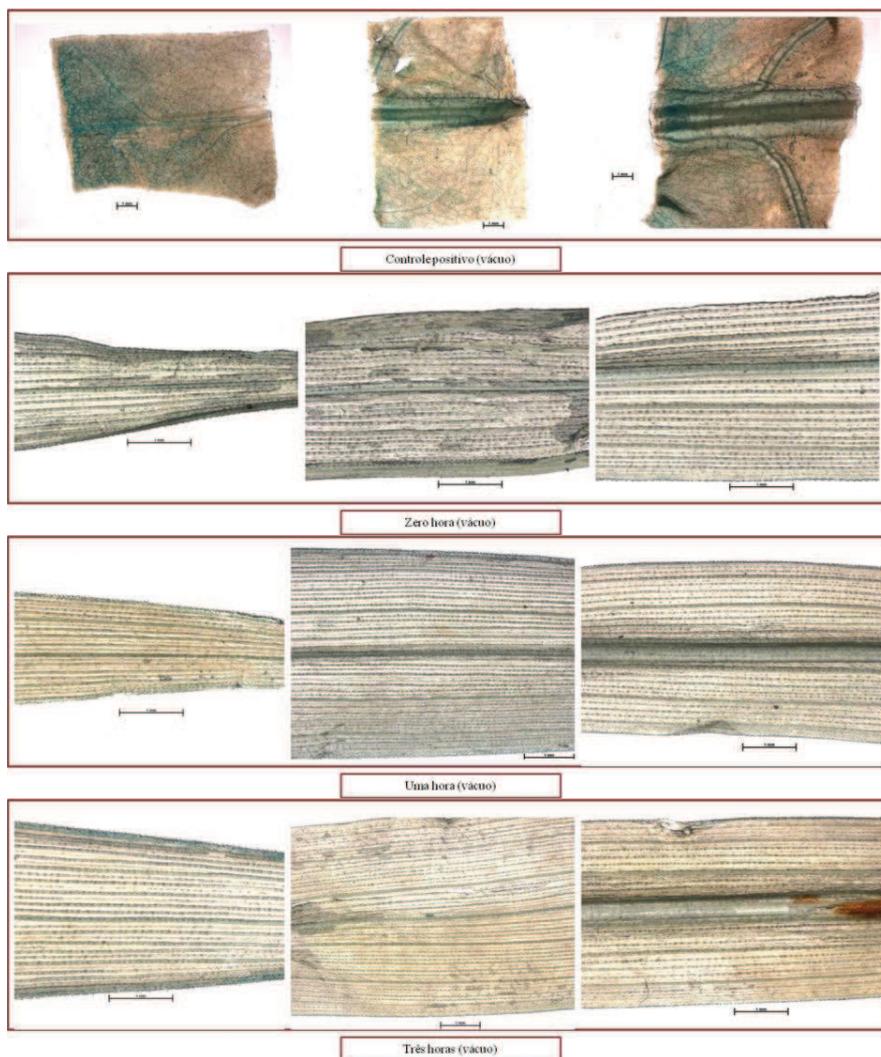


Figura 14 Folhas transformadas com *atrC* full::o*GUSi* pulverizadas com etanol 10% e coletadas e imersas em solução GUS por 24 horas. As coletas foram realizadas nos tempos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 horas

(...continua...)

“Figura 14, conclusão”



Na literatura, não há resultados semelhantes de expressão restrita   borda da folha. Mesmo assim, a restri o da expressão pode ser devido ao método de indu o, a pulveriza o nas folhas, concluindo como não eficaz para este experimento. Além disso, já descrito na literatura que pequenas concentra es são mais favoráveis   indu o, ao invés de altas concentra es de etanol, fator esse que ajuda a baixa expressão (SALTER et al., 1998; VREUGDENHIL et al., 2006).

5.6 Bioensaio com adição de etanol em meio líquido e baixa concentração de etanol

Como os resultados de bioensaio com pulverização de etanol 10% não foram satisfatórios, pois a expressão se restringiu à borda da folha, outro ensaio foi desenhado com a imersão dos perfilhos em tubos de ensaio contendo meio de cultivo e adição de etanol e outros compostos. Entretanto, os resultados iniciais mostraram uma alta atividade de *GUS* nos controles negativos (plantas não transformadas) indicando haver atividade endógena de *GUS* em *Setaria viridis*. Desta forma, foi realizado outro bioensaio, nas mesmas condições (imersão de perfilhos), porém, variando-se o pH da solução X-gluc, com o objetivo de se identificar a melhor condição para suprimir a atividade endógena observada.

5.6.1 Bioensaio de atividade endógena de *GUS* em *S. viridis*

Com o objetivo de se avaliar diferentes condições de análises histoquímicas visando-se eliminar as atividades endógenas de *GUS*, previamente observadas, foi desenhado um bioensaio com plantas não transformadas.

Diferentes pHs da solução de *GUS* (pH 4,5; 6,0 e 7,0) e plantas não transformadas foram coletadas após 12 horas e imersas em meio MS acrescido de etanol 0,1%, concentração observada por Andrade (2000). Nas condições de pH 4,5, a coloração azul é predominante em todos os tecidos (Figura 15, painel à esquerda). Já nas condições de pH 6,0, a coloração se restringe à borda dos tecidos (Figura 15, painel central) e no pH 7,0, a coloração azul não foi observada em nenhum dos tecidos (Figura 15, painel à direita). Os resultados apresentados na Figura 15, comprovam que existe alta influência do pH da solução X-gluc nas análises histoquímicas de *GUS*, em *Setaria viridis*, conforme observado para tabaco (ROSADO, 2012; SOLÍS-RAMOS et al., 2010). Os

resultados também demonstram que em condições de pH neutro (pH = 7,0) não foi possível observar essa atividade endógena de *GUS*. Desta forma, essas condições foram utilizadas nos ensaios posteriores.

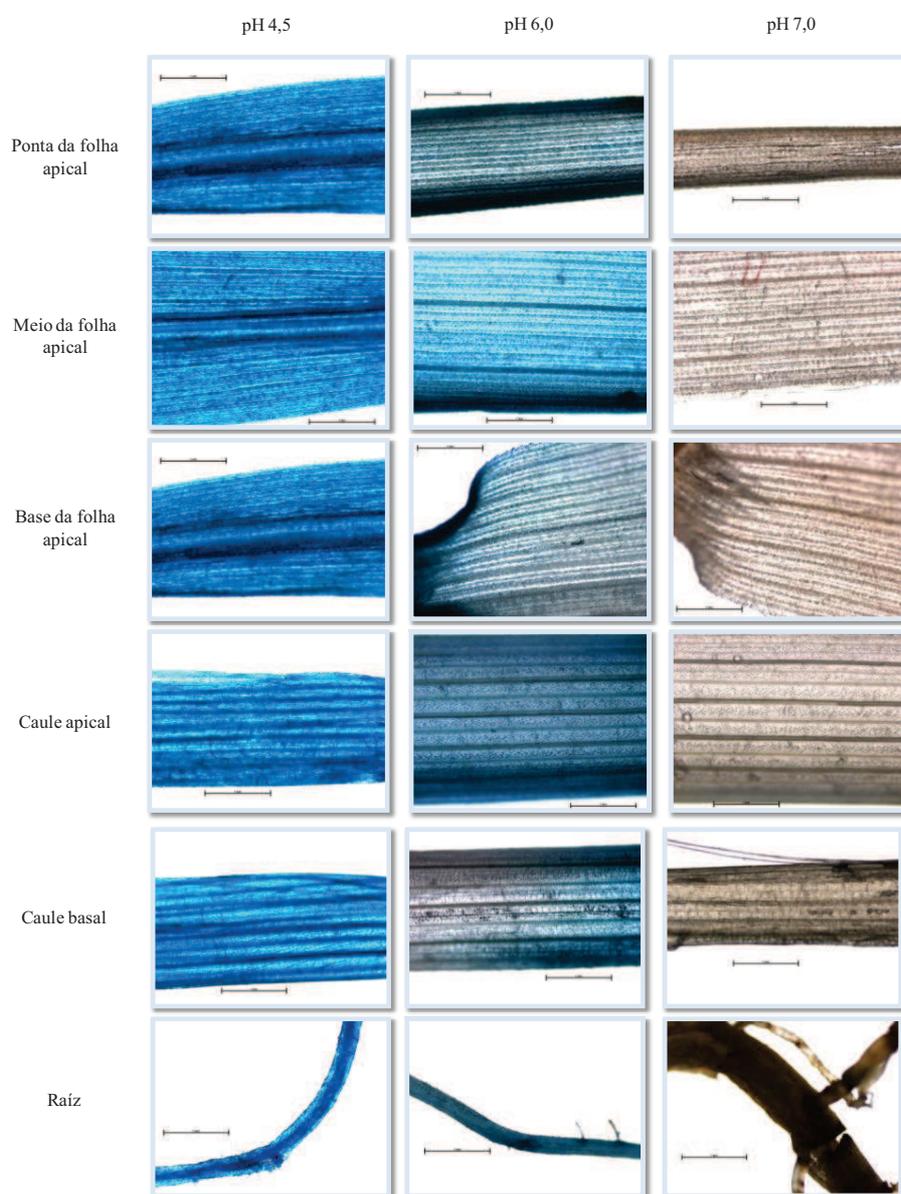


Figura 15 Teste histoquímico de plantas não transformadas induzidas com etanol 0,1% por 12 horas. Coletas da ponta, meio e base da folha, caule apical, caule basal e raiz foram colocadas por 24 horas em solução X-gluc com pH 4,5, 6,0 e 7,0

5.7 Bioensaios com imersão das raízes dos perfilhos em meio líquido e adição de compostos químicos

Com a certificação do pH 7,0 como ótimo, outro ensaio foi montado para se avaliar a indução do promotor *atrC* full::*GUS*i. O teste histoquímico foi baseado em diferentes concentrações de etanol: 0,1%, 1,0% e 2,5%, ciclo-hexamida 1% e controles (água). Foram avaliados também, diferentes tempos de tratamentos: 0, 6, 12, 24 e 36 horas após o tratamento.

Após os tratamentos, foi avaliada a atividade enzimática de *GUS* somente nas raízes (Figura 16). Os dados mostram que não houve atividade enzimática de *GUS* no tempo de 0 hora, indicando que nenhuma atividade endógena foi detectada nestas condições. Da mesma forma, o tratamento controle com água não apresentou coloração em nenhum dos tempos avaliados, indicando que o promotor *atrC* não apresenta expressão basal em *S. viridis*. Foi observada atividade de *GUS* após 24 horas do tratamento com ciclo-hexamida 1% (Figura 16). Já com o tratamento de 0,1% de etanol, verificou-se atividade de *GUS* nos tempos de 6 e 36 horas, após a adição do composto. Entretanto na concentração de 1,0%, não foi observada coloração em nenhum dos tempos testados. Ao contrário do tratamento com 2,5% de etanol, em que foi observada atividade de *GUS* após 24 horas (Figura 16). Esses resultados confirmam os dados obtidos por Andrade (2000), indicando que o promotor *atrC* pode ser induzido por etanol e ciclo-hexamida 0,1%. e 1% respectivamente.

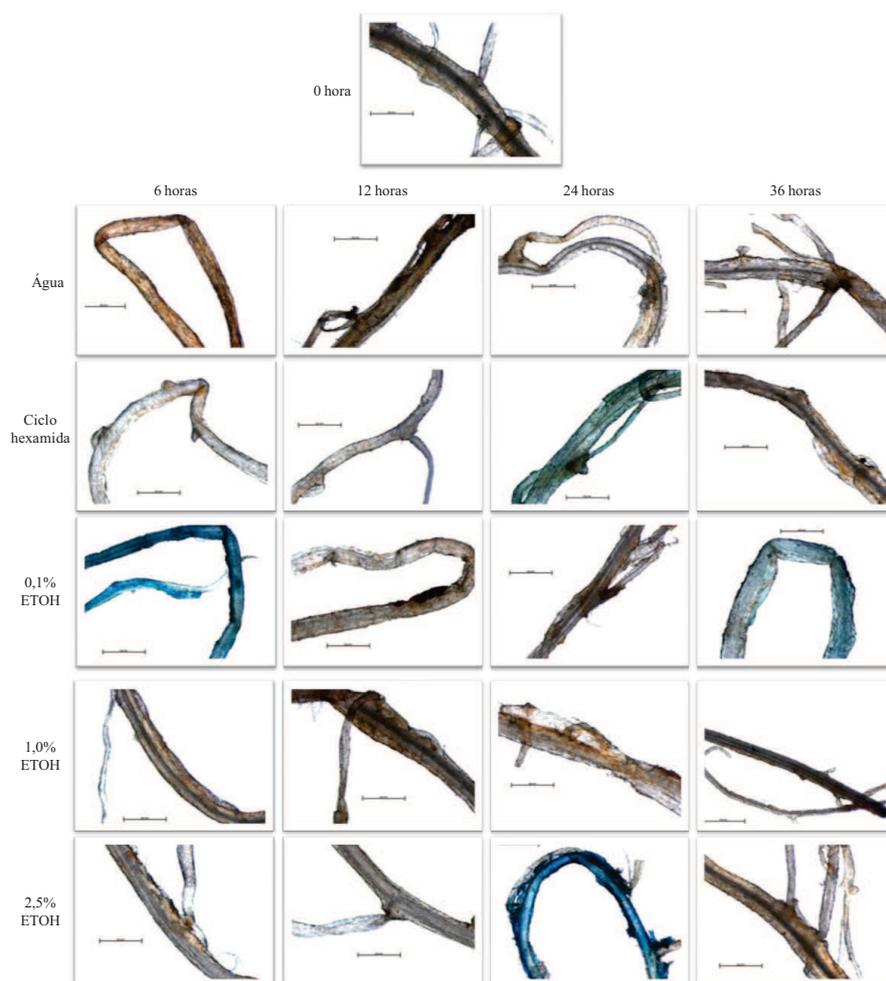


Figura 16 Raízes de *Setaria viridis* induzidas com água, ciclo-hexamida 1%, etanol 0,1%, etanol 1,0%, etanol 2,5% em tempos de 0, 6, 12, 24 e 36 horas

5.8 qPCR

Os resultados de qPCR apresentaram expressão diferencial. Os tratamentos com indução de etanol 0,1% e 1,0%, representadas como 4 e 5,

respectivamente, exibiram um aumento expressivo em comparação aos outros tratamentos realizados, ciclo-hexamida 1% e etanol 2,5% (Figura 17).

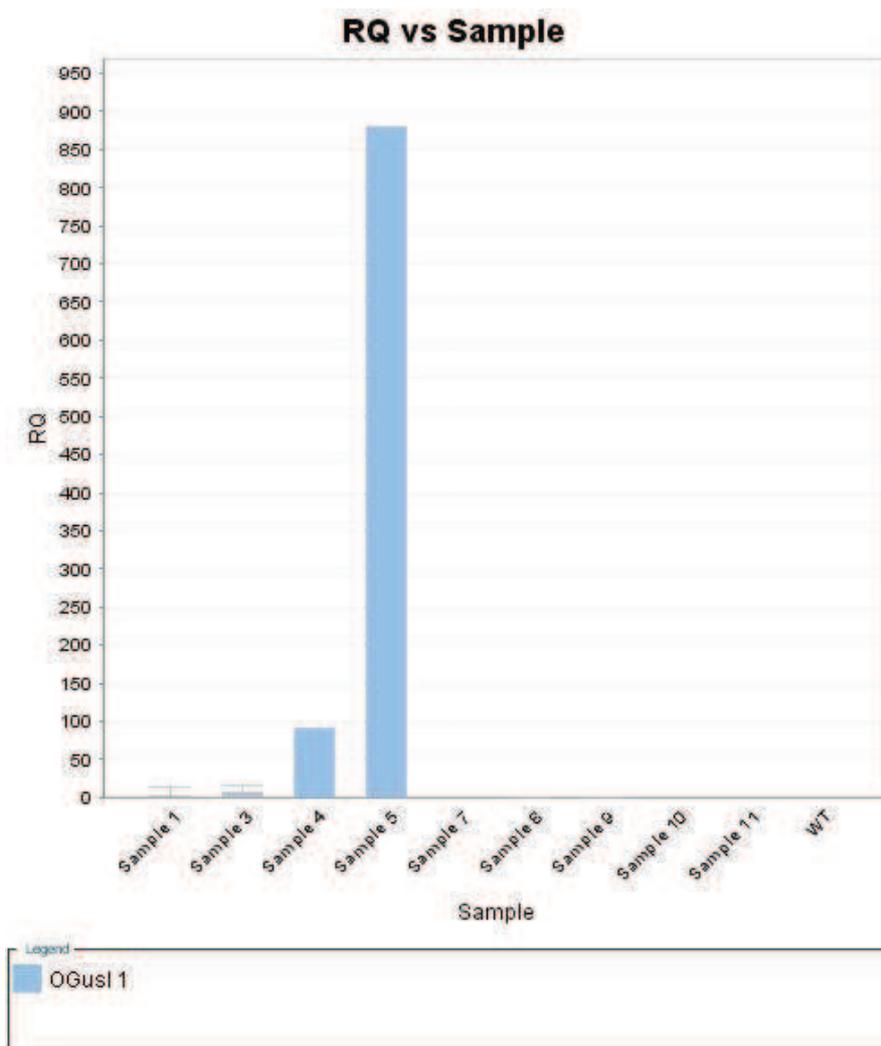


Figura 17 Resultado qPCR de *Setaria viridis* em presença de compostos químicos (par *primer* oGUSi F1/R1): S 1 zero hora, S 3 ciclo-hexamida 1%, S 4 etanol 0,1%, S 5 etanol 1%, S 7 água, S 8 ciclo-hexamida 1%, S 9 etanol 0,1%, S 10 etanol 1%, S 11 etanol 2,5%, WT way type

A qPCR confirmou a funcionalidade do promotor *atrC* em plantas, mesmo este sendo um promotor fúngico. E mostrou ainda que este promotor tem uma melhor indutibilidade em pequenas concentrações de etanol, conforme observado por Andrade (2000). Foi comprovado ainda, que a expressão foi favorecida nas seis primeiras horas de indução, sendo a expressão negativa no tempo de doze horas.

6 CONCLUSÕES

- a) Foram obtidas plantas transgênicas *atrC* full::*uidA* a partir de três eventos independentes de transformação;
- b) Foi detectada atividade endógena de *GUS* em *S. viridis*, nas condições dos bioensaios realizados neste estudo (0,1% etanol), em condições de pH ácido do tampão X-gluc;
- c) Baixa atividade de *GUS* foi detectada nos bioensaios com pulverização de 10% etanol em plantas transformadas de *S. viridis* com o promotor fúngico *atrC*;
- d) Bioensaios com a imersão dos perfilhos de *S. viridis* em meio líquido e adição de ciclo-hexamida 1% e etanol (0,1% e 2,5%) resultaram na detecção de atividade *GUS* em raízes de plantas transformadas, confirmando a indução do promotor *atrC* por esses compostos, também em *S. viridis*;
- e) A qPCR confirmou a diferença de expressão em concentrações mais baixas de etanol, comprovando a indutibilidade do promotor *atrC* em *S. viridis*.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. C. **ABC transporters and multidrug resistance in *Aspergillus nidulans***. 2000. 155 f. Thesis (Doctor in Phytopathology) - Wageningen Universiteit, Wageningen, 2000.

ANDRADE, A. C. et al. The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents end in antibiotic production. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 263, n. 6, p. 966-977, July 2000.

ANGERMAYR, K. et al. Expression of *atrC* – encoding a novel member of the ATP binding cassette transporter family in *Aspergillus nidulans*: is sensitive to cycloheximide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1453, n. 2, p. 304-310, Feb. 1999.

ARRUDA, P. Genetically modified sugarcane for bioenergy generation. **Science Direct**, New York, v. 23, n. 3, p. 315-322, June 2012.

BOLSA DE VALORES DE SÃO PAULO. **Bovespa opera em queda por instabilidade do petróleo e EUA**. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://economia.terra.com.br/noticias/noticia.aspx?idNoticia=201102241404_RTR_1298556252nN24238761#tarticle>. Acesso em: 2 jul. 2013.

BRANDALISE, M. **Isolamento e caracterização de promotores tecido-específicos de raiz e folha de *Coffea arabica***. 2007. 141 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

BRANDÃO, A. D. **Efeito da giberelina A₃ e do paclobutrazol no metabolismo de carboidratos e expressão gênica em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*)**. 2010. 270 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

BROWN, N. J.; PARSLEY, K.; HIBBERD, J. M. The future of C4 research maize, flaveria or cleome? **Trends Plant Science**, Cambridge, v. 10, n. 5, p. 215-221, May 2005.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. de. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: E. Blucher, 2010. p. 365-380.

BUTLER, J. E. F.; KADONAGA, J. T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 20, p. 2583-2592, Oct. 2002.

CARNEIRO, A. A. et al. **Transformação genética de embriões zigóticos da linhagem de milho tropical L3 mediada por *Agrobacterium tumefaciens***. Sete Lagoas: Eletrônica-Comunique Comunicação, 2009. 16 p.

CASTRO, A. M. de; PEREIRA, N. J. Produção, propriedade e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHILTON, M. D. et al. *Agrobacterium* rhizogenes inserts T-DNA into genomes of the host plant root cells. **Nature**, London, v. 295, p. 432-434, 1982.

CIS-ACTING REGULATORY ELEMENT. Disponível em: <<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

CNI-IEL. **Álcool combustível**. Brasília: Instituto Euvaldo Lodi, 2008. 163 p. (Série Indústria em Perspectiva).

DE WAAR et al. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 3, p. 195-207, Mar. 2006.

DRAPER, J. et al. transformation of plants cells by DNA mediated gene transfer. In: _____. **Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual**. Oxford: Blackwell Scientific, 1988. p. 161-198.

EBAH. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfuLUAD/as-rotas-etanol-celulosico-no-brasil>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

ESCOBAR, H. Na busca por mais etanol, ciência tenta reinventar a cana. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, n. 539881, 2010. Vida, p. A26-27.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood and cellulosic chemistry**. New York: D.N.S. Hon, 1991. 200 p.

GANDER, E. S.; MARCELLINO, L. H. Plantas transgênicas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 34-37, maio 1997.

GODWIN, I. D.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. In vitro approaches to extending the host range of *Agrobacterium* for plant transformation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 40, n. 6, p. 751-763, 1992.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 1, n. 6, p. 1-7, May 2008.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, Campinas, v. 119, p. 293-299, May 2012.

GREEN, R. B. et al. Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. **Developmental Biology**, San Diego, v. 129, n. 15, p. 3645-3656, Aug. 2002.

HERRERA-ESTRELLA, L. et al. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid derived vector. **Nature**, London, v. 303, p. 209-213, May 1993.

HO, J.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*): the morphology and physiology of callus formation and the ontogeny somatic embryos. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 118, p. 169-180, 1983.

JUVEN-GERSHON, T.; KADONAGA, J. T. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. **Developmental Biology**, Elsevier, v. 339, n. 2, p. 225-229, Aug. 2010.

LEWIN, B. Promotores e intensificadores. In: _____. **Genes IX**. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 609-639.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* e *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031-3037, Mar. 2011.

LONG, J. et al. Catalytic delignification of sugarcane bagasse in the presence of acidic ionic liquids. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 200, p. 99-105, Feb. 2013.

MACHADO, F. B. P. **Brasil, a doce terra:** história do setor. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/Conheca%20%20Setor.asp>>. Acesso em: 3 maio 2005.

MASLOW, J. N. et al. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 17, n. 2, p. 1543-1564, Aug. 1993.

MESHITSUKA, G.; ISOGAI, A. Chemical structures of cellulose, hemicelluloses and lignin. In: HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. (Ed.). **Chemical modification of lignocellulosic materials**. New York: M. Dekker, 1996. p. 11-34.

RAO, J. T. Sugarcane origin, taxonomy, breeding and varieties. In: _____. **Sugarcane varietal improvement**. Coimbatore: ICAR, 1987. p. 83-113.

REHAGRO. **Cana-de-açúcar tratada com cal virgem:** uma alternativa. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=2242>>. Acesso em: 11 fev. 2014.

RIZZATTI, A. C. et al. Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 4, p. 237-244, Apr. 2008.

ROSADO, G. L. **Indução do promotor *GmNAC6* por elicitores de estresses e mapeamento de regiões reguladoras**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

SALTER, H. A. et al. Characterisation of ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 127-132, June 1998.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista de Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 15, p. 81-91, June 2000.

SILVA, A. M. **Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decubens* Stupf (braquiária)**. 2005. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Curitiba, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, July 2010.

SÓLIS-RAMOS et al. Endogenous *GUS*-like activity in *Capsicum chinense* Jacq. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 13, n. 4, p. 6-12, July 2010.

SONGSTAD, D. D.; SOMERS, D. A.; GRIESBACH, R. J. Advances in alternative DNA delivery techniques. **Plant Cell**, Rockville, v. 40, p. 1-15, Jan. 1995.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Conquistas do setor sucroenergético na matriz energética brasileira**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 2 jul. 2013.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Safra recorde: moagem atinge 594,10 milhões de toneladas até primeiro de janeiro**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 28 abr. 2014a.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Vendas de etanol ao mercado doméstico crescem 23,49% na safra 2013/2014**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 18 jan. 2014b.

VREUGDENHIL, D. et al. Ethanol-inducible gene expression: non transformed plants also respond to ethanol. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 9-11, Jan. 2006.

WACLAWSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 263-276, Apr. 2010.

YAZAKI, K. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 1183-1191, Dec. 2005.

ZHENG, Z.; MURAI, N. A distal promoter region of the rice seed storage protein glutelin gene enhanced quantitative gene expression. **Plant Science**, Shannon, v. 128, p. 59-65, Sept. 1997.