UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ILSE FERNANDA FERRARI

Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-
açúcar (*Saccharum* ssp.) em sistemas modelo Micro-Tom
(*Solanum lycopersicum* L)

Piracicaba
2012

ILSE FERNANDA FERRARI

Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-
açúcar (*Saccharum* ssp.) em sistemas modelo Micro-Tom
(*Solanum lycopersicum* L)

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura
e no Ambiente

Orientador: Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba
2012

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Ferrari, Ilse Fernanda

Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) em sistema modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L)/ Ilse Fernanda Ferrari; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

94 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Agrobacterium 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Insetos nocivos
4. Plantas transgênicas 5. Regulação gênica 6. Resistência genética vegetal
7. Tomate I. Título

CDU (633.61 + 635.64) : 631.528.1

A toda minha família

Aos meus pais Osmar e Meire pelo amor, pela minha formação pessoal e profissional e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida

A minhas irmãs Isis e Ione, pelo companheirismo, amor e amizade eterna

DEDICO

A Deus que faz que o impossível seja possível

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais Osmar C. Ferrari e Meire C. S. Ferrari, por todo apoio, carinho, compreensão e dedicação nesse período da minha vida, me motivando a seguir em frente e superar todas as dificuldades. As minhas irmãs Isis e Ione e minha tia Sueli Ferrari, por fazerem parte da minha vida, tornando-a mais leve e feliz;

Ao Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira pela oportunidade de realização das atividades no Laboratório de Melhoramento de Plantas;

A FAPESP pela concessão da bolsa e financiamento do projeto;

Aos meus grandes amigos, Geraldo Silva e Roberto Camargo, em especial a Mariana Belloti pelo convívio, risadas, apoio, troca de idéias, experiências e informações na vida acadêmica e cotidiana, que me ajudaram a encaram os experimentos frustrados e por se tornarem minha “família” em Piracicaba;

A Maria Letícia, pelo convívio nestes anos de mestrado, pelos “perrengues”, aprendizados, desabafos, alegrias, e por todas as situações inusitadas que nos fizeram ri ou chorar, por essa amizade que ao longo do tempo só fez crescer e consolidar;

Aos meus queridos amigos Cesar Bueno e Andrea Akemi, por toda a ajuda na execução do projeto, pelas dicas e orientações à distância, dadas ao longo da realização deste trabalho. Aos meus amigos Gustavo Barboza, Daniela Carvalho, Manuel Vieira e Tanara Novaes, por estarem sempre ao meu lado;

Ao Prof. Lazaro Eustáquio, do laboratório de controle hormonal do desenvolvimento vegetal - ESALQ , por permitir que os experimentos utilizando tomateiro fossem desenvolvidos em seu laboratório e a aluna de mestrado Mariana Azevedo pela ajuda na execução destes experimentos;

Aos companheiros do Laboratório de Melhoramento de Planta pela troca de experiência na bancada, pela paciência e disponibilidade em me ensinar, pelos protocolos e discussões que enriquecera minha formação, em especial aos amigos Danielle Scotton, Francisco Cláudio Lopes, João Felipe Nebó, Juliana Deganello,

Amanda de Almeida, Letícia Bilato, Juliana Leles e principalmente a estagiária Amanda Betega pelo grande auxílio prestado na parte final do desenvolvimento do trabalho e pela amizade;

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA: Benedita Inês Rodrigues, Myrian Raquel Orsi, Paulo Cassieri Neto, Wlamir Godoy e José Benedito Alves, pelo imenso auxílio prestado durante minhas atividades em laboratório;

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, principalmente aos técnicos Marcelo Favareto e Renata Cruz, por serem sempre prestativos, pelos conhecimentos compartilhados e uso de equipamentos. Em especial ao Marcelo, por estar sempre disposto a me socorrer nos pequenos e eventuais problemas laboratoriais, pelo apoio e disponibilidade, principalmente na fase final do trabalho, e por sua amizade;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

“A ciência é uma verdade
transitória”

Prof. Carlos Cerri – CENA/USP

RESUMO

FERRARI, I. F. **Caracterização de promotores de expressão específica de cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) em sistemas modelo Micro-Tom (*Solanum lycopersicum* L).** 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

O emprego de novas tecnologias, como a transgenia, associadas ao melhoramento convencional de cana-de-açúcar apresenta grande potencial no combate a pragas e desenvolvimento de novas variedades. Entretanto, a falta de especificidade na expressão temporal e/ou local dos genes introduzidos tem se mostrado um fator limitante para o sucesso de produtos derivados da transgenia. Os promotores das metalotioneínas, por exemplo, podem representar uma alternativa ao uso de promotores constitutivos, particularmente, aqueles de metalotioneínas do tipo 1 (MT1) por apresentarem níveis elevados de expressão, em diferentes tecidos/órgãos e serem responsivos a estresses bióticos e abióticos. O uso de promotores sintéticos, contendo apenas elementos-cis, como *GCG-like*, *W boxes* e *JERE*, tem sido relevante por induzirem a expressão gênica local em resposta ao ataque de agentes bióticos. Este trabalho teve por objetivo a caracterização funcional de promotores de genes de metalotioneínas de cana-de-açúcar e o uso de elementos regulatórios sintéticos e, em paralelo, avaliou-se o uso de promotores sintéticos no controle da expressão gênica em cana-de-açúcar. Após as análises de expressão transiente, verificou-se que o promotor *SoMT1b* apresentou atividade GUS e GFP em epitélios de cebola e os promotores sintéticos, *4X Wbox*, *4X GCC-like*, *4X JERE* e *4xW 4xS-box*, e o promotor *SoMT1b* foram capazes de dirigir a expressão do gene repórter *uidA* (GUS) em calos embriogênicos de cana-de-açúcar. Em análise de expressão estável, o promotor *SoMT1b* foi capaz de dirigir a expressão do gene GUS para os frutos e sementes de tomate 'Micro-Tom', mas não foi responsivo a estresse por herbivoria, cádmio e cobre. Também foi realizada a transformação de plantas de cana-de-açúcar, as quais ainda estão sendo analisadas. Os resultados obtidos demonstram a funcionalidade do promotor *SoMT1b*.

Palavras-chave: *Saccharum* ssp., promotores sintéticos, promotores de metalotioneínas, 'Micro-Tom', expressão transiente, expressão estável, β -glucuronidase (GUS).

ABSTRACT

FERRARI, I. F. **Characterization of promoters specific expression of sugar cane (*Saccharum spp.*) In model systems Micro-Tom (*Solanum lycopersicum L.*)**. 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

New technologies, like genetic transformation, associated with conventional breeding of sugarcane have a large potential in developing new varieties tolerant to biotic and abiotic stress. However, the lack of specificity in the spatial and/or temporal expression of the introduced genes has been a limited factor for the success of products derived from transgeny. Metallothionein promoters, for instance, can represent an alternative to the use of constitutive promoters, particularly those from metallothionein type 1 (MT1) because they present high expression levels in different tissues / organs and are responsive to biotic and abiotic stress. Another alternative is the use of synthetic promoters which contain only cis elements, as GCG-like, W-box and JERE, which induces local gene expression in response to pathogen attack. In this work, we aimed to make the functional characterization of sugarcane metallothionein promoters and synthetic regulatory elements, in parallel, we evaluated the use of synthetic promoters in the control of gene expression in sugarcane. After transient expression analysis, it was found that SoMT1b promoter was able to control the expression of the reporter genes to GUS and GFP in onion epithelium and GUS in sugarcane embryogenic calli. Additionally, synthetic promoters 4X Wbox, 4X GCC-like, 4X JERE and 4xW 4xS-box were able to direct the expression of the gene uidA (GUS) in embryogenic calli of sugarcane. In stable transformation analysis, SoMT1b promoter was capable of directing uidA expression in fruits and seeds of tomato cv. 'Micro-Tom', but it was not responsive to herbivory, cadmium and copper stress. It was also carried out the transformation of sugarcane plants with the construction containing the SoMT1b promoter, but these are still being analyzed. The results demonstrate the functionality of the SoMT1b promoter in sugarcane and tomato.

Keywords: *Saccharum ssp.*, synthetic promoters, metallothionein promoters, "Micro-Tom", transient expression, stable expression, β -glucuronidase (GUS).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Cana-de-acúcar	16
2.2 Resposta a estresse biótico	17
2.3 Melhoramento genético e avanços biotecnológico em cana-de-açúcar	18
2.4 Transformação genética de cana-de-açúcar	20
2.5 Papel dos promotores na transgenia	21
2.5.1 Promotores de Metalotioneínas em cana-de-açúcar	23
2.5.2 Promotores sintéticos	25
2.6 Plantas modelos	27
3 OBJETIVOS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material vegetal	29
4.2 Construção dos vetores de expressão pelo sistema Gateway	29
4.2.1 Desenho dos iniciadores	29
4.2.2 Amplificação das regiões promotoras	30
4.2.3 Clonagem em vetor de entrada	31
4.2.4 Mini-preparação do DNA plasmidial	32
4.2.5 Digestão de DNA plasmidial	33
4.2.6 Sequenciamento das construções	33
4.2.7 Clonagem em vetor de expressão	34
4.3 Análise de expressão transiente em epitélio de cebola	35
4.3.1 Ensaio histoquímico	36
4.4 Transformação genética de tomate	37
4.4.1 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
4.4.2 Transformação genética de tomate	38
4.4.3 Regeneração e aclimação de plântulas de tomate	39
4.4.4 Extração de DNA total de Tomateiro Micro-Tom	39
4.4.5 Ensaio de estresse biótico em plantas transgênicas de tomate	40
4.4.6 Ensaios de estresse por metais pesados em plantas transgênicas de tomate	41
4.4.7 Ensaios de estresse oxidativo em plantas transgênicas de tomate	41
4.5 Transformação genética de cana-de-açúcar	42

4.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar.....	42
4.5.2 Transformação via biobalística	43
4.5.3 Transformação de cana-de-açúcar via <i>Agrobacterium</i>	44
4.5.4 Regeneração <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar	44
4.5.5 Extração de DNA total de cana-de-açúcar.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Promotores sintéticos	47
5.1.1 análise de expressão do gene <i>uidA</i> em calos de cana-de-açúcar dirigida por promotores sintéticos.....	48
5.1.2 Transformação gnética de cana-de-açúcar com promotores sintéticos.....	50
5.2 Desenvolvimento de promotores endógenos de metalotioneínas e inclusão de motivos sintéticos	52
5.2.1 Análise qualitativa da em epitélio de cebola	57
5.2.2 Análise funcional do promotor <i>SoMT1b</i> em plantas de Tomate cv 'Micro-Tom'	59
5.2.2.1 Estudo do padrão temporal da atividade do promotor <i>SoMT1b</i>	61
5.2.2.2 Estudo da indutibilidade do promotor <i>SoMT1b</i> por estresse biótico e abiótico	65
5.2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar	69
5.2.3.1 Análise de expressão transiente em calos de cana-de-açúcar.....	70
5.2.3.2 Transformação estável calos de cana-de-açúcar	72
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERENCIAS	76
APÊNDICES.....	89

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância nas regiões tropicais. No Brasil, apresenta elevada participação econômica e social na agroindústria, pois se trata de uma cultura robusta e eficiente na produção de biomassa, utilizada para a produção de açúcar, etanol e eletricidade. As cultivares de cana-de-açúcar pertencem à família Gramineae (Poaceae) e ao gênero *Saccharum* L, apresentam um complexo genoma com um número de cromossomo $2n = 99-130$ (D'HONT et al., 1998).

Devido à importância desta cultura e a imensa área utilizada para seu plantio em escala industrial, os estresses bióticos e abióticos consistem num dos principais fatores limitantes, prejudicando a produtividade e qualidade da matéria prima, reduzindo a eficiência econômica do setor sucroalcooleiro.

As plantas reagem ao estresse por meio de uma variedade de respostas celulares, moduladas por regulação da transcrição para a indução ou repressão de genes, levando a mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares afetando o crescimento e o desenvolvimento vegetal.

Compreender os mecanismos moleculares que determinam as respostas aos estresses permite o desenvolvimento de cultivares tolerante a condições adversas, através da manipulação genética, além de facilitar a exploração do potencial gênico na identificação de promotores endógenos e expressão estímulo-específicos.

Na maioria dos casos, para o controle da expressão de genes introduzidos em plantas transgênicas experimentais têm sido utilizados promotores constitutivos, o que resulta na expressão do gene alvo em todas as células da planta, sob uma vasta gama de condições fisiológicas. No entanto, em algumas monocotiledôneas, a atividade desse promotor é reduzida (WILMINK et al., 1995), sendo frequentemente observado o processo de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional causado pela inserção de várias cópias homólogas do gene sob controle de promotor constitutivo quando empregada a biobalística (MATZKE et al., 1994).

Uma alternativa à expressão constitutiva seria promover a expressão dos transgenes em determinados tecidos ou mediante a imposição de estresse, mas para que isso seja possível, deve-se identificar e caracterizar novas regiões

promotoras de genes que possuam padrões de expressão potencialmente interessantes para esta aplicação.

Em recente trabalho desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP, foram identificadas regiões promotoras de metalotioneínas (MTs) de cana-de-açúcar, que poderiam ter um papel importante na homeostasia de metais essenciais e ser responsivos a estresses bióticos e/ou abióticos (SERENO, 2009).

As metalotioneínas do tipo 1 são proteínas induzidas por patógenos ou danos mecânicos e estariam envolvidas na regulação dos íons metálicos disponíveis, subsequentemente afetariam a produção de espécies reativas de oxigênio nas plantas estressadas (CHOI et al., 1996). Estudos indicam que MT-tipo 1 apresenta expressão em distintos tecidos/órgão, tratando-se de um promotor com potencial biotecnológico para regular a expressão de transgenes com indução por estresses bióticos e abióticos (SERENO, 2009).

Como uma alternativa aos promotores endógenos, promotores sintéticos têm sido investigados por representarem versões simplificadas de promotores naturais, contendo apenas elementos-cis de interesse (RUSHTON et al., 2002). Alguns promotores induzidos por ataque de agentes bióticos já foram caracterizados, e contém elementos-cis específicos responsivos a ataque de patógenos, como GCG-like (OHME-TAGAKI et al., 2000), W boxes (RUSHTON et al., 1996) e JERE (MENKE et al., 1999). Em alguns casos, o uso de um elemento-cis específico leva a uma maior indução da expressão gênica local em resposta ao ataque de agentes bióticos.

A caracterização de regiões promotoras requer técnicas eficientes de introdução de genes exógenos em plantas, que envolvem a transformação genética e regeneração de plantas *in vitro* associadas a rápidos avanços nos sistemas de manipulação de genes, consolidando a tecnologia de transformação genética em cana-de-açúcar (ELLIOTT et al., 1998).

Estudos de promotores através de expressão transiente em epitélio de ceboa, configuram uma abordagem relevante para a determinação da atividade do promotor e também para verificar a estabilidade da transformação (GEIJSKES, 2011).

A transformação via biobalística e empregando *Agrobacterium* tem sido usada para produção de plantas transgênicas, porém o sucesso desta técnica ainda é limitado para a cana-de-açúcar. Uma alternativa é a utilização de plantas modelo

como *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom (LIMA et al., 2004), na manipulação gênica por apresentar algumas vantagens como facilidade de transformação, genoma sequenciado, ciclo de vida curto, tamanho reduzido e cultivo de diversas gerações em casa de vegetação facilitando os estudos genéticos e fisiológicos (VAECK et al., 1987), permitindo o entendimento de processos biológicos, determinação da função gênica, prova de conceito e análise de genes, que podem, em seguida, ser aplicados nas espécies alvo (XIONG et al., 1999).

Com base nos dados gerados por Sereno (2009), este trabalho teve por objetivo realizar a caracterização funcional de promotores de genes de metalotioneínas de cana-de-açúcar e o uso de promotores contendo elementos-cis regulatórios em epitélio de cebola, tomate e cana-de-açúcar. Em paralelo, avaliou-se o uso de promotores sintéticos, no controle da expressão gênica em cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à família Gramineae (Poaceae) e ao gênero *Saccharum* L, originária do sudeste Asiático, com centro de dispersão localizado entre a Nova Guiné e a Indonésia (DANIELS; ROACH, 1987). As cultivares são híbridos derivados principalmente do cruzamento entre a espécie domesticada rica em sacarose *Saccharum officinarum* ($2n = 80$) e a espécie selvagem *S. spontaneum* ($2n = 40-128$), do cruzamento com híbridos naturais *S. sinense* ($2n=104-128$), *S. barberi* ($2n= 60-140$), e raramente *S. robustum* ($2n=60-170$) também são reportados. As cultivares atuais apresentam um complexo genoma com um número de cromossomo $2n = 99-130$ (D'HONT et al., 1998; MUDGE et al., 2009; PAPINI-TERZI et al., 2009), com aneuploidia.

A cana-de-açúcar atual é uma cultura robusta e eficiente na produção de biomassa, cultivada para obtenção de colmos, os quais acumulam elevados níveis de sacarose, são utilizados tanto para a produção de açúcar, etanol e eletricidade a partir da fibra (WACLAWOVSKY et al., 2010).

O agronegócio sucroalcooleiro brasileiro vem se destacando devido a uma combinação de fatores, como as perspectivas para o crescimento dos mercados internos e externos de etanol, a tendência em longo prazo de aumento dos preços internacionais do petróleo, aliada a uma preocupação mundial em obter alternativas energéticas sustentáveis e renováveis (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Atualmente a cultura da cana no Brasil ocupa cerca de 7 milhões de hectares (ÚNICA, 2012). A previsão do total de cana processada na safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas, com aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas (CONAB, 2012).

2.2 Resposta a estresse biótico

As plantas reagem a alterações ambientais através de uma variedade de respostas celulares, causando alterações fisiológicas que podem ser moduladas por regulação da transcrição para a indução ou repressão de genes, levando a mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, afetando adversamente o crescimento e desenvolvimento vegetal (SCHENK et al., 2000; WANG et al., 2001; ROCHA et al., 2007).

Algumas doenças têm efeitos diretos no desenvolvimento das plantas, reduzindo a produtividade na cultura, em particular, na cultura da cana-de-açúcar, as doenças causadas por fungos, bactérias e vírus têm sido uma grande preocupação (GONÇALVES, 2008). Dentre as doenças que são caracterizadas pela ação fúngica, destaca-se a ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, quando há alta porcentagem de infecção no início do desenvolvimento da planta, provoca redução dos colmos (SANTOS, 2008).

As doenças causadas por bactérias, como *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*, que é o agente causal do raquitismo-da-soqueira, contribuem nas reduções no conteúdo de sacarose da planta. (DAVIS et al., 1994). Esta doença não é facilmente reconhecida no campo por sintomas externos, uma vez que podem ser confundidos por vários outros fatores abióticos (COMSTOCK et al., 1997).

O ataque de insetos-praga a partes aéreas e/ou sistema radicular das plantas, prejudica a produtividade da cana, reduzindo a eficiência econômica de produção tanto para a indústria do açúcar como do álcool (ROCHA et al., 2007). Entre as pragas, a principal é a broca da cana (*Diatraea saccharalis*), cujas larvas danificam a planta de cana perfurando o colmo, onde empupam e de onde os adultos emergem (WHITE et al., 2001; SILVA, 2008).

A cigarrinha-da-raiz (*Mahanarva fimbriolata*) é outro destaque entre as pragas, pois durante a sua alimentação, o adulto da cigarrinha injeta toxinas que causam redução no tamanho e diâmetro dos entrenós, causando grande perda na produtividade da cana (ALMEIDA, 2003).

No sistema de interação planta-inseto, as plantas utilizam uma variedade de proteínas de defesa e metabólitos secundários para sua proteção. Pompermayer (2004) mostrou que o ataque de insetos induz a expressão de uma série de genes, entre eles, a lipoxigenase, polifenol oxidase, cistatina e metalotioneínas.

Dentre os genes que codificam proteínas com propriedades anti-metabólicas aos insetos destacam-se os inibidores de proteinase (GRUDEN et al., 2004). Diversos estudos demonstraram que os inibidores de proteinase, quando presentes em dietas artificiais ou em plantas transgênicas, são capazes de interferir no crescimento e desenvolvimento de um grande número de insetos (RYAN, 1990; PAULILLO et al., 2012). A expressão heteróloga de inibidores de proteinase em plantas transgênicas apresenta potencial para o controle de pragas (AUGUSTYNIAK et al., 1997; FALCO et al., 2003; WENG et al., 2006).

O controle dos ataques de agentes bióticos na cultura da cana-de-açúcar pode ser realizado através do controle biológico (ROSAS-GARCÍA, 2006), obtenção de genótipos mais resistentes (WHITE et al., 2001) e o uso de mudas saudáveis para o plantio (COMSTOCK et al., 1997).

Compreender os mecanismos moleculares que determinam as respostas de estresse em cana-de-açúcar é útil para a melhoria por manipulação genética, este conhecimento aliado ao uso da engenharia genética, certamente será valioso para orientar a seleção de genes alvo, permitindo o desenvolvimento de variedades tolerantes a condições adversas, além de poder explorar o potencial gênico da cana na identificação de promotores endógenos de expressão estímulo-específicos (ROCHA et al., 2007).

2.3 Melhoramento genético e avanço biotecnológicos em cana-de-açúcar

O melhoramento genético é o principal responsável pela produção e incorporação de diversas características de interesse agrônomo nas cultivares atuais de cana-de-açúcar (PICELLI, 2010). No entanto, esse método esbarra em uma série de limitações, tais como: a redução do pool gênico, a ligação gênica e a incompatibilidade sexual. Além disso, o tempo necessário para transferir caracteres desejáveis para os indivíduos pode ser de décadas, no caso de espécies bienais e perenes, ou em espécies altamente heterozigotas (FRIZZAS et al., 2004).

O aumento da demanda por novos e promissores clones aliado às limitações no progresso do melhoramento genético clássico promove cada vez mais a ascensão das ferramentas biotecnológicas, como a transformação genética (PICELLI, 2010).

A cana-de-açúcar talvez exemplifique um dos genomas mais complexos dentre as plantas cultivadas devido a diferenças estruturais, numéricas e recombinacionais entre cromossomos das duas espécies genitoras (GRIVET; ARRUDA, 2002). Esta complexidade tem dificultado o entendimento dos mecanismos gênicos e a capacidade de melhorar a cultura (JACKSON et al., 2012). Dessa forma, fica clara que o estudo do genoma se tornou uma valiosa ferramenta para a descoberta de genes de interesse, de forma rápida e eficaz, podendo gerar informações úteis ao melhoramento genético (GRIVET; ARRUDA, 2001).

O Projeto Transcriptoma da cana-de-açúcar da FAPESP (SUCEST, Sugarcane EST Project) foi concluído em 2003, representa uma grande contribuição no estudo da genômica da cana-de-açúcar, com o sequenciamento de mais de 260.000 sequências expressas (ESTs, Expressed Sequence Tags) a partir de bibliotecas de cDNA, de vários tecidos e órgãos em vários estágios de desenvolvimento (VETTORE et al., 2003). Onde foram identificando prováveis transcritos relacionados ao metabolismo de sacarose, tolerância seca e a estresse abiótico e resistência a doenças e pragas (CAMARGO, 2007).

As informações obtidas constituem uma importante base molecular para o desenvolvimento biotecnológico da cultura, uma vez que esforços direcionados ao melhoramento genético dos híbridos de cana-de-açúcar invariavelmente esbarram na complexidade do seu genoma (VETTORE et al., 2003).

A transgenia tornou-se uma alternativa para complementar os programas de melhoramento e tem como grande vantagem a possibilidade de transferência apenas dos genes desejados entre espécie sexualmente incompatíveis. Esta técnica já possibilitou a produção de plantas contendo características de interesse comercial, como tolerância à herbicida, resistência a doenças e pragas, tolerância à seca, aumento do teor de sacarose (FALCO et al., 2000; BRAGA et al., 2001; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

Entretanto, um dos gargalos da transgenia é a aprovação de uma linhagem comercial, sendo um requisito fundamental a expressão estável do transgene em diversas gerações (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

2.4 Transformação genética de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar apresenta características que a tornam uma planta viável para a transgenia, como a facilidade para regeneração de plantas *in vitro* a partir de calos e modo de multiplicação em escala comercial por propagação vegetativa (LIMA et al., 2001).

A transformação genética de cana foi primeiramente descrita por Chenet et al. (1987), que obtiveram massas celulares transgênicas a partir de protoplastos tratados com polietilenoglicol (PEG), a partir de então diversas técnicas de transformação genética de híbridos de cana-de-açúcar já foram descritas (CHEN et al., 1987; ARENCIBIA et al., 1998; ELLIOTT et al., 1998).

Considerando a complexidade da integração do transgene no genoma, sendo este um fator determinante na expressão gênica, dois principais métodos de transformação genética de plantas vêm sendo amplamente explorados, sendo estes, transformação mediada por *Agrobacterium* e bombardeamento de micropartículas ou biobalística (JACKSON et al., 2012).

Atualmente, o bombardeamento de micropartículas (FRANKS; BIRCH, 1991) para produção de plantas transgênicas a partir de calos gerados por meio da embriogênese somática (BOWER; BIRCH, 1992), tem sido amplamente explorado (FALCO et al., 2000).

Utilizando microprojéteis (ouro ou tungstênio) acelerados a altas velocidades (superiores a 1.500 km.h^{-1}) para carrear e introduzir ácidos nucleicos em células e tecidos. As micropartículas aceleradas penetram na parede e membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas células. Em seguida, o DNA é dissociado ocorrendo o processo de integração do gene exógeno no genoma do organismo a ser modificado (RECH et al., 1991; ARAGÃO et al., 2012).

O método de transformação via biobalística permite a transferência direta de genes para uma ampla gama de cultivares, sendo menos dependente do genótipo da planta (ALTPETER et al., 2005). Podendo ser empregado em estudos de expressão transiente, que apresenta vantagens como a rápida produção de proteínas e capacidade de utilizar espécies para as quais a cultura de tecidos e/ou regeneração têm-se mostrado difícil (GEIJSKES, 2011), configurando uma abordagem relevante para a determinação da atividade do promotor e também para verificar a estabilidade da transformação (GHOSH-BISWAS, 2006).

Porém, uma desvantagem na utilização de calos de cana como alvos para transferência de genes é que pode promover o desenvolvimento de variação somaclonal, sendo intensificado pelo longo período de cultura *in vitro* necessário para a obtenção de calos embriogênicos, resultando em menor desempenho na regeneração de plantas (VICKERS et al., 2005; GILBERT ETAL et al., 2009).

Outro ponto seria a introdução de grandes quantidades de DNA no genoma, o que pode levar a um silenciamento do gene inserido, porém a complexidade de integração do transgene no fenômeno de silenciamento ainda não é bem conhecida (BIRCH et al., 2010).

O método de transformação via *Agrobacterium*, baseia-se na ativação de genes de virulência (região vir), localizados no plasmídeo Ti presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium*. A região vir promove a transferência da região denominada de T-DNA ("transferred DNA"), que apresenta bordas responsáveis por transferir um segmento de DNA para a célula infectada (STACHEL et al., 1985; HORSCH; KLEE, 1986), possibilitando a produção de linhagens transgênicas com um baixo número de cópias do DNA transferido (JACKSON et al., 2012; YADAV et al., 2012).

Contudo, o processo de transformação via *Agrobacterium* é altamente dependente do genótipo utilizado e em várias espécies de monocotiledoneas tem apresentado baixa eficiência, limitando a utilização em cana-de-açúcar (SHRAWAT; LORZ, 2006; JACKSON et al., 2012).

2.5 Papel dos promotores na transgenia

Promotores são regiões do genoma responsáveis pela regulação da expressão dos genes, uma vez que contêm os sítios de ligação para as RNA polimerases, e as informações sobre o controle local, temporal, ontogenético e respostas a estímulos ou sinalizações (GRIFFITHS et al., 2000; LEWIN, 2004).

A região promotora de um gene em eucariotos, por definição, compreende a região 5' da sequência transcrita, muitos promotores contêm uma sequência conservada, denominada *TATA Box*, localizada a ~25 pares de base a montante do ponto inicial da transcrição da RNA polimerase II. E elementos promotores proximais localizados a cerca de 100 pares de base (*CCAAT Box*) e 200 pares de

base (*GC Box*) acima do ponto de início da transcrição (GRIFFITHS et al., 2000). Tais sequências determinam o ponto correto do início e a taxa da transcrição, bem como o local e o momento em que este processo deverá ocorrer (LAKSHMANAN et al., 2005).

O nível de expressão de um gene pode ainda ser modulado pela interação do promotor a elementos-cis reguladores. A indutibilidade e força do promotor podem variar dependendo do número de cópias e espaçamento de elementos-cis em relação ao *TATA-Box* (VENTER, 2007).

Os elementos cis-reguladores atuam na regulação da transcrição em resposta a estímulo exógeno ou endógeno, através de interação específica com proteínas reguladoras, desencadeando mudança na atividade do promotor (MÜLLER; WASSENEGGER, 2004).

Na maioria dos casos a expressão dos genes em plantas geneticamente modificadas é controlada por promotores constitutivos, como o promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (*CaMV*) (FUTTERER et al., 1993), de actina de arroz (*Act*) (MCELROY et al., 1990) ou da ubiquina de milho (*Ubi*) (JOGSMA et al., 1995). A utilização desses promotores resulta na expressão do gene alvo em todas as células da planta, em todos os estágios de desenvolvimento e sob uma vasta gama de condições fisiológicas (TZAFRIR et al., 1998), ao passo que, por exemplo, o ataque das pragas ocorre em regiões e estágios de desenvolvimento discretos. Em algumas monocotiledôneas, no entanto, a atividade desses promotores é reduzida (WILMINK et al., 1995; SCHENK et al., 1999)

Embora elevados níveis de transcrição possam parecer desejáveis para a produção de grandes quantidades do produto transgene (JORGENSEN, 2003), tem sido freqüentemente observado o processo de silenciamento gênico transcricional e pós-transcricional causado pela inserção de várias cópias homólogas de um transgene sob controle de promotores constitutivos notadamente quando empregada a biolística (MATZKE et al., 1994; MATZKE; MATZKE, 1995; Park et al., 1996). Segundo Müller e Wassenegger (2004), as elevadas concentrações de um produto transgene poderiam induzir as vias de degradação, gerando efeitos prejudiciais sobre o crescimento e desenvolvimento da planta, que poderiam limitar o uso de promotores constitutivos e ressaltam a necessidade da identificação de novas regiões promotoras visando aplicação biotecnológica.

Para a cana-de-açúcar, em particular, poucos promotores endógenos foram descritos, como os promotores de cana poliubiquitina *ubi4* e *ubi9*, que apresentam expressão bastante elevada em clos de cana transformados através de bombardeamento de partículas (WEI et al., 2003).

Os promotores de ubiquina de milho apresentam expressão em quase todos os órgãos sendo independente de estímulos externos (WEI et al., 2003). O promotor do vírus bacilliform badnavirus de cana-de-açúcar apresenta atividade constitutiva em caule, folha, raiz e sistema vascular, quando expresso em *Arabidopsis thaliana* (TZAFRIR et al., 1998).

Uma alternativa à expressão constitutiva seria promover a expressão dos transgenes somente em locais, estágios ou condições específicos, minimizando os efeitos secundários nocivos (YOSHIDA; SHINMYO, 2000). Para que isso seja possível, torna-se fundamental a identificação e caracterização de regiões promotoras de genes que possuam padrões de expressão potencialmente interessantes para esta aplicação, como por exemplo, gene expresso especificamente em determinados tecidos ou mediante estresse biótico como ataque de patógenos (NUTT et al., 1999; YOSHIDA; SHINMYO, 2000).

2.5.1 Promotores de Metalotioneínas em cana-de-açúcar

Em recente trabalho desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas, CENA/USP, foram identificadas região promotora presumível de quatro genes (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* e *SoMT3*) codificadores de metalotioneínas (MTs) em cana-de-açúcar (SERENO, 2009).

As metalotioneínas (MT) pertencem a uma superfamília de proteínas não enzimáticas, de baixo peso molecular (5-10 kDa), ricas em aminoácidos cisteína (Cys) e que apresentam grande afinidade com metais (HAMER, 1986). Metalotioneínas são divididas em duas classes baseado nos resíduos de cisteína (FIGUEIRA et al., 2001).

Metalotioneínas classe I são comuns em vertebrados e reconhecidas por conferirem tolerância ao cádmio e possuem arranjos conservados de cisteína, já as MTs classe II são encontradas em plantas, fungos e animais invertebrados e não apresentam arranjo específico de cisteína (RAUSER, 1999). Existem quatro tipos de

MTs da classe II em plantas (tipo 1, 2, 3 e 4 ou Ec), classificadas de acordo com o número e distribuição de cisteínas na sequência primária de aminoácidos da proteína (ROBINSON et al., 1993; RAUSER, 1999).

Evidências indicam que as metalotioneínas possuem um papel importante na homeostasia de metais essenciais, como zinco e cobre, estando provavelmente associadas com transporte de metais (COZZA et al., 2006). No entanto, alguns trabalhos demonstraram a indução das metalotioneínas em resposta a estresse biótico e abiótico. As metalotioneínas do tipo 1 de tabaco são proteínas induzidas por patógenos ou danos mecânicos e estariam envolvidas na regulação dos íons metálicos disponíveis, afetando a produção de espécies reativas de oxigênio nas plantas estressadas (CHOI et al., 1996).

Em cana-de-açúcar foram identificados seis genes, altamente expressos, codificadores de metalotioneína, sendo dois do tipo 1 (SoMT1a e SoMT1b), dois do tipo 2 (SoMT2a e SoMT2b), um do tipo 3 (SoMT3) e um do tipo 4 ou Ec (SoMT4) (FIGUEIRA et al., 2001; SERENO, 2009). As regiões promotoras de *SoMT1a* e *SoMT1b* apresentam motivos típicos de regiões promotoras de eucariotos, tais como o *TATA-box*, normalmente presente a ~30 pares de base do ponto de início da transcrição e elementos proximais (CCAAT-box), tipicamente localizados a ~100 pares de base acima do ponto de início da transcrição (CCAAT-box) (STEPHEN; JAMES, 2003; SERENO, 2009).

As regiões promotoras putativas de *SoMT1a* e *SoMT1b* compartilham a maioria dos motivos encontrados, mas também apresentam alguns motivos exclusivos de cada tipo, evidenciando uma possível diferença regulatória na expressão destes genes (SERENO, 2009).

Os promotores putativos de MT da cana-de-açúcar apresentam os motivos '(T)TGAC(C)' ou 'TGAC', reconhecidos por membros da família de fatores de transcrição W-box, que estão associados à resposta ao ataque biótico (SERENO, 2009). Este motivo é especialmente reconhecido por uma proteína WRKY induzida por ácido salicílico (CHEN; CHEN, 2000), e se encontra presente no início de ambas as sequências promotoras. A forma 'TTGACC' reconhecida por membros pertencentes à mesma família W-box, é especificamente induzida por elicitores fúngicos (EULGEM et al., 2000) e foi observada somente para a região promotora de *SoMT1b* (SERENO, 2009).

Um segundo elemento relacionado à resistência a doenças pode ser reconhecido na mesma posição do elemento '(T)TGAC(C)' acima mencionado, na sequência antisense, nas regiões promotoras de ambas SoMT1 (SERENO, 2009). Trata-se do motivo 'TGTCA', que em arroz, reconhece o produto do gene OsBIHD1, que codifica para um fator de transcrição induzido durante a patogênese (LUO et al., 2005). O motivo 'AACGTGT', presente apenas uma vez em cada sequência SoMT1 (SERENO, 2009), é responsivo ao estresse provocado por ferimentos e estresse tênsil e foi identificado na região promotora do gene *extA* (extensina) de *Brassica napus* (ELLIOT; SHIRSAT, 1998).

Por último, dois motivos associados à resposta a estresse abiótico estão presentes nos genes SoMT1, o elemento 'AGAA', responsivo a choque térmico, e 'CCACG', conhecido como ERSE-I, que são elementos de resposta ao estresse do retículo endoplasmático (VITALE; CERIOTTI, 2004; ZHOU et al., 2006; SERENO, 2009). Em plantas, esses elementos parecem estar envolvidos em processos específicos, como o desenvolvimento da semente e em resposta a patógenos (VITALE; CERIOTTI, 2004).

Tendo em vista o padrão de expressão dos genes MTs e a presença de elementos-cis regulatórios, os promotores putativos de SoMT1 identificados por Sereno (2009) apresentam potencial biotecnológico para regular a expressão de transgenes com indução por estresses bióticos e abióticos (FIGUEIRA et al., 2001; SERENO, 2009).

2.5.2 Promotores sintéticos

Como uma alternativa aos promotores endógenos, promotores sintéticos foram propostos por representarem versões simplificadas dos promotores caracterizados, contendo apenas os elementos-cis de interesse (RUSHTON et al., 2002). As plantas apresentam regiões promotoras que contém vários elementos cis distintos responsáveis por modular um ou mais aspectos do perfil de expressão. Uma estratégia para diminuir esta complexidade é produzir promotores sintéticos contendo apenas um elemento-cis definido (SALINAS et al., 1992). A estratégia de utilizar promotores sintéticos de plantas, que direcionam a expressão gênica em resposta a patógenos, poderia ser usada para ajudar a elucidar as vias de sinalização

de genes alvo e produzir plantas com maior resistência a doenças e pragas (RUSHTON et al., 2002).

Alguns promotores induzidos por ataque de agentes bióticos já foram caracterizados e contém elementos-cis específicos, como 'GCC-like' (OHME-TAGAKI et al., 2000); 'W boxes' (RUSHTON et al., 1996; EULGEM et al., 2000) e 'JERE' (AGACCGCC) (MENKE et al., 1999). Rushton et al. (2002), demonstrou a funcionalidade dos elementos cis regulatórios, induzidos por patógenos, em direcionar a expressão gênica, utilizando plantas de *Arabidopsis* transformadas com os promotores sintéticos contendo elementos W-box (4 X), GCC-like (4 X) e JERE, dirigidos pela sequência mínima do promotor CaMV35S. do vírus do mosaico da couve flor.

O elemento W-Box, pertencente a superfamília de fatores de transcrição WRKY, e foram clonados inicialmente de batata-doce (*Ipomoea batatas*; *sp1*), aveia selvagem (*Avena fatua*; *ABF1*, 2), salsa (*Petro-selinum crispum*; *PcWRKY1*, 2,3) e *Arabidopsis* (*ZAP1*), com base na capacidade das proteínas codificadas em se ligarem especificamente ao motivo (T)TGAC (C/T); estes motivos podem mediar a transcrição em resposta a patógenos e estão presentes nos promotores de muitos genes de plantas que estão associadas com defesa (EULGEM et al., 2000).

Ohme-Takagi e Shinshi (1990), analisando promotores de genes de defesa, identificaram a presença de uma sequência conservada referido como um motivo 'GCC-like'. Estudos em tabaco (*Nicotiana* ssp.; ERE) e tomate (*Solanum* ssp.) demonstram que o motivo 'GCC' regula a resposta a etileno e resposta a defesa, fornecendo uma ferramenta para vincular transdução de sinal de etileno à via de transcrição do gene (OHME-TAGAKI et al., 2000).

Em estudos realizados com plantas transformadas de *Catharanthus roseus*, demonstrou-se que o elemento cis 'JERE' é o primeiro elemento relatado a apresentar indução em resposta a jasmonato (MeJA) e elicitor (alcalóide indólico terpenóides – TIA) da via biossintética do gene strictosidine sintase (Str) (MENKE et al., 1999).

Considerando que as cascatas de sinalização em resposta a ataque de agentes bióticos, insetos-praga, o uso de promotores sintéticos é uma abordagem relevante para amplificação do sinal de ataque de insetos-praga (RUSHTON et al., 2002; HEIL, 2009). No entanto, a caracterização de regiões promotoras, assim como a introdução de genes exógenos em plantas (transgenia), requer o estabelecimento

de técnicas de transformação genética e regeneração de plantas altamente eficientes, associados a avanços nos sistemas de manipulação de genes (ROCHA et al., 2007).

2.6 Plantas modelos

O uso de plantas modelos, como *Solanum lycopersicum*, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, se mostra de grande importância nos estudos genéticos e fisiológicos, pois permite o entendimento de processos biológicos, a determinação da função gênica e aprova de conceito e análise de genes, que podem, em seguida, ser aplicados nas espécies alvo (XIONG et al., 1999). O emprego de plantas modelos na manipulação gênica apresenta vantagens como facilidade de transformação, ciclo de vida curto, plantas de porte pequeno, grande número de descendentes, genoma pequeno e sequenciado (VAECK et al., 1987; MEINKE, et al., 1998).

O tomateiro cv. Micro-Tom (*Solanum lycopersicum*) leva cerca de 100 dias após transformação de cotilédones para a colheita de frutos de transgênicos, permite a triagem de até quatro gerações por ano, e tem um genoma diplóide relativamente pequeno ($n=12$) (TANKSLEY, 1993). Por apresentar uma caráter recessivos, traços dominantes podem ser analisados em plantas na primeira geração (em heterozigose), contudo é necessário mais uma geração para transferir genes recessivos, obtendo uma linhagem homozigota, sendo então possível estudos mais detalhados do padrão gênico do transgene (MEISSNER et al., 1997)

Apesar dos estudos em plantas modelos não garantirem a boa performance dos transgenes na espécie alvo, há uma correlação positiva entre a resposta observada em plantas modelos e a espécie alvo em diversos casos. O uso de plantas modelos é uma estratégia eficaz no estudo de genes envolvidos em respostas a estresses abióticos e bióticos, visando o melhoramento genético de culturas de importância comercial (MEINKE, et al., 1998; XIONG et al., 1999).

3 OBJETIVO

Caracterizar funcionalmente dois promotores de genes de metalotioneínas de cana-de-açúcar e avaliar o uso de elementos regulatórios sintéticos acrescentados ao promotor de metalotioneína (*SoMT1a*), através de transformação genética de cana-de-açúcar, epitélio de cebola e tomate 'Micro-Tom'.

Avaliar a abordagem do uso de promotores sintéticos, induzidos por ataque de pragas em transformação genética de cana-de-açúcar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.

4.1 Material Vegetal

Para os experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar utilizou-se a cultivar, 'IAC SP93-3046', fornecidas pela Dra. Silvana Creste Souza do Centro de Cana do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Ribeirão Preto, SP e as cultivares 'SP80-3280' e 'RB83 5486', fornecidas pelo Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-açúcar da Universidade Federal de São Carlos.

Para os experimentos de transformação de plantas modelos foram utilizados tomateiros *Solanum lycopersicum* (cultivar 'Micro-Tom'). As sementes foram fornecidas pelo Prof. Lazaro Eustáquio Pereira Peres, do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

Para as análises qualitativas da expressão dos promotores de metalotioneínas, acrescidos ou não de uma sequência regulatória sintética, foram utilizados epitélios de cebolas (*Allium cepa*) obtidas em comércio local.

4.2 Construção dos vetores de expressão pelo sistema Gateway

4.2.1 Desenho dos iniciadores

Oligonucleotídeos específicos para o promotor *SoMT1a* foram desenhados e sintetizados, adicionando-se à porção 5' nucleotídeos correspondentes aos elementos-cis regulatórios JERE ou W-box e um sítio de restrição para a enzima *HindIII* (Tabela 1).

Os elementos-cis regulatórios introduzidos, os iniciadores desenhados, em conjunto com a sequência disponível do promotor *SoMT1a* (SERENO, 2009), foram submetidos a análise para identificação de possíveis elementos regulatórios utilizando o banco de dados PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

Tabela 1 - Iniciadores *forward* utilizados para adição de elementos-cis regulatórios, JERE ou W-box, ao promotor *SoMT1a*. As sequências em negrito indicam os elementos-cis regulatórios, as sequências sublinhadas correspondem ao sítio de restrição da enzima *HindIII*

Iniciador	Elemento-cis	Sequência (5'→3')
W-Box <i>SoMT1a</i>	WRKY	<u>AAGCTTTT</u> GACCA CTATAGGGCACGCGTGGT
JERE <i>SoMT1a</i>	JERE	ACGCGTGGT AGACCGCC <u>AAGCTT</u> GGCCCTA

4.2.2 Amplificação das regiões promotoras

A região promotora de metalotioneína *SoMT1b* foi amplificada a partir de plasmídeos, de acordo com Sereno (2009), utilizando os iniciadores PP2 ('ACTATAGGGCACGCGTGGT3') e *SoMT1a*-R2b (5'TCTACCAAAGGGCGTCTTACAAAGTCGTCT3'). Para a adição dos elementos-cis regulatórios ao promotor *SoMT1a*, utilizou-se 0,1 µM de um dos iniciadores específicos *forward* descritos na tabela 1 combinado com a mesma concentração do iniciador *SoMT1a*-R2a (5' ATCTACCAAAGGGCGTCTTACAAAGTCGTT 3') (SERENO, 2009).

Cada reação de amplificação continha ainda 0,1 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase *High Fidelity* (Invitrogen); *High Fidelity Buffer* 1X; 0,2 mM de Mix dNTPs e 2 mM de MgCl₂; 5 ng de DNA plasmidial, num volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 4 min; 40 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 40 s e 72°C por 1 min e 30 s; e finalizando a 72°C por 7 min, sendo que nesta etapa de extensão foi adicionado à reação 0,5 µL de dATP (10 mM) e 0,2 µL de *Taq* DNA Polymerase (Fermentas), para adenilação das extremidades dos fragmentos amplificados.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão SB 1X [NaOH 10 mM, pH 8,5; ajustado com ácido bórico (BRODY; KERN, 2004)]. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol e 15% ficol tipo 400-DL). As amostras foram coradas com *SYBR Gold nucleic acid gel stain* (Molecular Probes) e visualizadas por iluminação ultravioleta (UV). A imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão). Os fragmentos correspondentes ao tamanho esperado (aproximadamente 900 pb) foram recortados do gel e purificados utilizando kit *Purelink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen®, Eugene, OR, USA).

4.2.3 Clonagem em vetor de entrada

Os fragmentos obtidos com as reações de PCR foram clonados no vetor de entrada pCR8/GW/TOPO (Invitrogen®). As clonagens dos fragmentos neste vetor permitem que eles sejam posteriormente transferidos para o vetor de destino através da recombinação. A ligação do produto da PCR adenilado ao vetor de entrada utilizou o Kit pCR8/GW/TOPO TA *Cloning* (Invitrogen®). A reação de recombinação dos vetores continha 23 ng do vetor de entrada, 169 ng do vetor de destino pKGWFS7 e 2 µL de *Gateway LR Clonase II Plus mix*. A reação foi incubada a 25°C por 16 horas.

O vetor de entrada ligado ao fragmento de interesse foi inserido em *Escherichia coli*, cepa DB3.1, por eletroporação. Em um tubo de 1,5 mL, contendo 40 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa DB3.1, foi adicionado 1 µL da reação de ligação (~20 ng de DNA). Após ligeira homogeneização, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação (0,1 µm), previamente resfriada no gelo. A mesma foi colocada no eletroporador (Micropulser, BIO-RAD) e um pulso elétrico de 1,8 kV foi aplicado. Imediatamente após, foi adicionado à cubeta, 1 mL de meio SOC (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MgSO₄; 20 mM de glicose; pH 7,0). Após breve homogeneização, o conteúdo da cubeta foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e incubado a 37°C por 1 hora. A cultura foi plaqueada em meio LB sólido (Luria-Bertani, 1% de triptona, 0,5% de extrato de

levedura e 1% de NaCl, 1,5% ágar), contendo o antibiótico espectinomicina (100 mg.L⁻¹). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 16 h.

4.2.4 Mini-preparação do DNA plasmidial

Cinco colônias isoladas de *E. coli* DB 3.1 transformadas foram retiradas das placas de Petri e colocadas cada uma em um tubo de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido (sem ágar) com espectinomicina (100 mg.L⁻¹). Após 16 h de crescimento a 37°C com 250 rpm de agitação, as culturas foram transferidas para tubos de 1,5 mL, centrifugadas a 16.000 g por 1 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado de células, de cada tubo, foi totalmente ressuspendido em 300 µL de Solução I (50 mM de glicose, 10 mM de EDTA e 0,25 mM de Tris-HCl; pH 8,0), incubando-se a temperatura ambiente por 10 min. O próximo passo foi acrescentar 300 µL de Solução II (0,2 M de NaOH e 1,0% de SDS), misturar por inversão e incubar no gelo por 5 min. A seguir, acrescentou-se 300 µL de Solução III (3 M de KOAc pH 5,5), também foi misturado por inversão e novamente incubado no gelo por 5 min. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação por 10 min a 16.000 g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL e adicionou-se 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20°C por aproximadamente 15 min, seguido de uma centrifugação a 16.000 g por 15 min. Em seguida o líquido sobrenadante dos tubos foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com 500 µL de 70% álcool, submetidos conseqüentemente a mais uma centrifugação a 16.000 g por 5 min. Após o descarte do álcool, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente até que as amostras secassem. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0) com ribonuclease A (RNase A, Invitrogen®), na concentração de 50 µg.mL⁻¹, e incubadas a 37°C por 15 min.

O DNA plasmidial foi verificado por eletroforese em gel de 0,8% agarose corado com SYBR Gold nucleic acid gel stain, utilizando tampão SB 1X. A quantificação de DNA foi realizada em fluorômetro DyNA Quant 200 (Hoefer).

4.2.5 Digestão de DNA plasmidial

Os plasmídeos obtidos com as mini-preparações foram submetidos a reações de digestão enzimática, para confirmar o processo de clonagem de fragmentos. A reação foi iniciada com 1 µg de DNA plasmidial e 1 U de enzima de restrição. Foram utilizadas as enzimas *Sall* e *HindIII* para a construção *WRKY/SoMT1a* e as enzimas *EcoRI* e *Sall* para *JERE/SoMT1a*, para o promotor *SoMT1b* utilizo-se a enzima *XbaI*.

Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume adequado de tampão de carregamento corados com SYBR Gold nucleic acid gel stain (Molecular Probes), visualizado por iluminação UV. A imagem do gel foi adquirida com câmera digital e processada com o programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão).

4.2.6 Sequenciamento das construções

As amostras de DNA foram submetidas ao sequenciamento utilizando o kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences®). A reação de sequenciamento consistiu de 100-150 ng de DNA, 1X tampão save money, 1,0 µL mix kit, 0,25 µM de oligonucleotídeo específico do vetor pCR8 e água Milli-Q autoclavada para volume final de 10 µL. A reação foi submetida a 95°C por 20 seg, 30 ciclos de 50°C por 15 s, 60°C por 1 min em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Em seguida, as amostras foram precipitadas, adicionando 80 µL de isopropanol 65%, seguido de leve agitação. A mistura foi incubada em temperatura ambiente, no escuro, por 15 min. Centrifugou-se a 16.000 g por 30 min. O sobrenadante foi descartado com auxílio de micropipeta. Foram adicionados 150 µL de 60% etanol gelado, seguido de nova centrifugação por 15 min. Novamente o sobrenadante foi descartado e, então, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora e, em seguida, armazenadas a -20°C até o sequenciamento.

Para análise no seqüenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems), do Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP), a cada amostra foram acrescentados 10 µL de formamida, seguindo de agitação. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas com auxílio da ferramenta Multiple Sequence Alignment ClustalW (<http://align.genome.jp/>). As sequências obtidas foram analisadas pela ferramenta VecScreen presente no banco de dados do NCBI (*GenBank*), para identificar sequências de nucleotídeos que poderiam ser de origem do vetor.

4.2.7 Clonagem em vetor de expressão

Foi realizada a transferência dos insertos via recombinação para o vetor de destino Gateway, pKGWFS7 (Figura 1), para transformação de plantas. O vetor de destino foi selecionado por possuir os genes repórter *Egfp* da proteína green fluorescence protein (GFP) e *uidA* da enzima β-glucuronidase (GUS) e o gene de seleção em planta *nptII* conferindo resistência a canamicina (KARIMI et al., 2007).

A reação de recombinação dos vetores continha 23 ng do vetor de entrada, 169 ng do vetor de destino pKGWFS7 e 2 µL de Gateway LR Clonase II Plus mix. A reação foi incubada a 25°C por 16 h. Após esse período, foi adicionado 2 µg.µL⁻¹ de solução de proteinase K e incubado por 10 min a 37°C para a degradação das proteínas. Células da cepa DB3.1 de *E. coli* foram eletroporadas com o produto resultante da reação de recombinação, conforme já descrito, para o vetor PCR8 no item 4.2.3

Para a confirmação da transferência do inserto do vetor de entrada para o vetor de destino, cinco colônias isoladas para cada construção, pKGWFS7::SoMT1b, pKGWFS7::WRKY/SoMT1a e pKGWFS7::JERE/SoMT1a, foram crescidas em meio LB líquido contendo espectinomicina (100 mg L⁻¹) e o DNA plasmidial foi extraído por lise-alcálica (como descrito no item 4.2.4), quantificadas em fluorômetro DyNa Quant 200 (Hoefer), e usados em reações de amplificação por PCR utilizando os iniciadores GUS forward (5'CCCGGCAATAACATACGGCGT3') e reverse (5'CCTGTAGAAACCCCAACCCGT3') realizada através de reações que continham 0,1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas); Buffer 10X; Mix dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,1 µM dos iniciadores e 5ng de DNA plasmidial.

A termociclagem foi conduzida a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e finalizando a 72°C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão 1X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume de 2 µL de tampão de carregamento contendo SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain para cada 10 µL do volume de amostra, amplificando um fragmento de ~ 366 pares de base.

Figura 1 - Vetor de destino pKGWFS7 (Invitrogen®) selecionado para clonagem de fragmentos promotores, no sistema Gateway. A região de inserção antecede os genes repórter *Egfp* (GFP) e *uidA* (GUS)

4.3 Análise de expressão transiente em epitélio de cebola

Para o bombardeamento das construções pKGWFS7::SoMT1b, pKGWFS7::JERE/SoMT1a e pKGWFS7::WRKY/SoMT1a, foram empregados segmentos de epitélio de cebola de 2 cm, sendo estes dispostos no centro de placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água MilliQ (TIAN et al., 2011).

A preparação das micropartículas foi feita pesando-se 60 mg de tungstênio em um tubo de 1,5 mL, seguido de lavagem com 1 mL de 70% etanol. Nesta etapa o tubo contendo as micropartículas foi deixado em vortex por aproximadamente 1 min e depois em repouso durante 15 min. Após o repouso, centrifugou-se por 30 seg a

9 000 g, retirando o sobrenadante e lavando com 1 mL de água destilada (MilliQ) por 4 vezes, sempre ressuspensando e precipitando as micropartículas. Ao final das lavagens o material foi ressuspensado em 1 mL de 50% glicerol autoclavado e mantido no sonicador (banho ultrassônico Branson 220 a 50-60 Hz) enquanto aliquoteado (50 µL). Em seguida o material foi armazenado a -20°C até sua utilização.

Para a precipitação do DNA nas micropartículas, uma alíquota de 50 µL de micropartículas foi ressuspensada por sonicação por 5 min. Nessa alíquota adicionou-se uma massa total de 10 µg de DNA, obtidos pelo método minipreparação por lise alcalina, 50 µL de CaCl₂ (1 M) e 20 µL de espermidina (0,5 M), sendo vortexado por mais 3 min. Em seguida, a preparação foi centrifugada por 15 seg à 9.000 g e, na sequência, lavada com 200 µL de 70% etanol e 200 µL de etanol absoluto. Entre cada lavagem houve uma etapa de centrifugação, sendo ao final ressuspensado com 70 µL de etanol absoluto e imediatamente 6 µL das micropartículas foram depositadas sobre uma membrana carreadora Kapton 200HN de 24 mm de diâmetro (DuPont^{tm}). O acelerador de micropartículas utilizado nos experimentos utiliza hélio sob alta pressão (1100 psi), desenvolvido por Rech et al. (2008).

Após o bombardeamento do material vegetal, este ficou armazenado no escuro por 24 horas em temperatura ambiente, e posteriormente foi examinado usando confocal Olympus Fluoview Ver 2.0b no microscópio Olympus IX81 (Olympus, Hamburg, Germany), usando objetiva 20x. As imagens foram coletadas usando lasers de 488 nm para excitação e filtros de emissão 488-611 para o fluoróforo GFP. O aparelho foi utilizado no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Prof. Márcio de Castro Silva Filho, do Departamento de Genética, ESALQ/USP.

4.3.1 Ensaio histoquímico

Para a análise da atividade da β-glucuronidase (GUS), para detectar a expressão do gene *uidA*, os epitélios de cebola foram imersos no tampão de reação X-gluc {1 mM de X-gluc; 1 M de Na₂HPO₄; 1 M de NaH₂PO₄; 10 mM de EDTA; 0,5 mM de K₃Fe(CN)₆ pH 7,0; 0,5 mM de K₄[Fe(CN)₄].3H₂O pH 7,0; 0,1% de Triton X-100}. Após serem mantidos no escuro, a temperatura de 37°C por 24 horas,

os epitélios foram retirados do tampão e transferidos para 70% etanol, para clareamento dos tecidos de pigmentos, sendo trocados por três a quatro vezes.

4.4 Transformação genética de tomate

As transformações genéticas da cv 'Micro-Tom', via *Agrobacterium tumefaciens*, foram realizadas empregando as construções contendo o promotor de metalotioneína *pKGWFS7::SoMT1b* e a construção controle com o promotor *CaMV35S* (pCAMBIA2301).

4.4.1 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

As construções contendo os fragmentos promotores de interesse foram eletroporadas em *Agrobacterium tumefaciens* cepa *EHA105*, para posterior transformação de plantas. Em um tubo contendo 40 μL de células eletrocompetentes, foram adicionados 100 ng de plasmídeo e transferida para uma cubeta de eletroporação. A cubeta foi colocada em eletroporador e um pulso de corrente elétrica de 2,5 kV foi aplicado. Imediatamente após o pulso, foi adicionado à cubeta 1 mL de meio SOC. Após a homogeneização, o conteúdo da cubeta foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, o qual foi incubado, sob agitação de 120 rpm por 2 horas a 28°C. Um volume de 100 μL da cultura foi colocado para crescer em placas de Petri contendo meio LB sólido, rifampicina (100 mg.L^{-1}) e espectinomicina (100 mg.L^{-1}). As placas foram incubadas durante 2 dias a 28°C. Depois desse período, colônias isoladas foram selecionadas e crescidas em 5 mL meio LB líquido com os mesmos antibióticos, por 16 h, a 28°C. Para confirmar a presença da construção *pKGWFS7::SoMT1b*, as culturas de *Agrobacterium* foram utilizadas em reações de amplificação. Para tal, 1 μL da cultura crescida por 16 h foi diluída em 10 μL de água MiliQ autoclavada e aquecido por 10 min a 95°C em termociclador. A reação de amplificação foi preparada contendo 0,1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 1x Tampão; 0,2 mM de Mix de dNTPs, 2 mM de MgCl_2 e 0,1 μM dos iniciadores específicos *PP2* e *SoMT1bR2*. A amplificação foi conduzida a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por

1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e finalizando a 72°C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de 1% agarose e tampão 1X SB, tampão de carregamento contendo SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain, amplificando um fragmento de ~800 pares de base.

4.4.2 Transformação genética de tomate

Para a transformação de tomate foi utilizada cultura de *A. tumefaciens* cepa *EHA105* contendo a construção *pKGWFS7::SoMT1b*, de acordo com a metodologia descrita por Pino-Nunes et al. (2009). Colônias de *Agrobacterium* crescidas por dois dias em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com espectinomicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹), foram inoculadas em 50 mL de meio LB líquido, suplementado com os mesmos antibióticos e crescidas sob agitação orbital constante de 120 rpm, a 28°C e por 16 horas. Após esse período, a suspensão foi colocada num tubo estéril e sedimentada por centrifugação a 1.900 g, a 20°C e por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a *Agrobacterium* ressuspendida em meio MS líquido, suplementado com sacarose (30 g.L⁻¹) e a OD_{600nm} foi ajustada para 0,2-0,3; 10 minutos antes do co-cultivo, 100 µM de acetoseringona foi adicionado à suspensão de *Agrobacterium*.

Explantos cotiledonares foram retirados de plântulas de tomate da cultivar 'Micro-Tom' com 8 dias de idade e colocados em placas de Petri contendo meio MS suplementado com vitamina B5, sacarose (30 g.L⁻¹), 0,4 µM de ANA (ácido α-naftaleno acético) e 100 µM de acetoseringona. Uma ou duas gotas da suspensão bacteriana foram colocadas sobre os explantes. Após 10 min, a suspensão foi removida e duas folhas de papel filtro foram colocadas sobre os explantes, para retirar o excesso de *Agrobacterium*. O co-cultivo foi conduzido em meio MS sólido suplementado com vitamina B5; sacarose (30 g.L⁻¹); 0,4 µM de ANA; 100 µM de acetoseringona, por 2 d, no escuro e a 25°C.

4.4.3 Regeneração e aclimação de plântulas de tomate

Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio de regeneração, meio MS suplementado com vitamina B5; sacarose (30 g.L⁻¹); 5 µM de BAP (benzilaminopurina) e antibióticos (25 mg.L⁻¹ meropenem, para controle da *Agrobacterium* e 100 mg.L⁻¹ canamicina, para seleção das plantas), e mantidos em sala de luz com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro), a 25°C. A cada duas semanas, os explantes foram transferidos para meio de regeneração novo, suplementado com antibióticos. Quando as gemas adventícias formadas nos explantes estavam com tamanho maior que 5 mm, elas foram isoladas e transferidas para frascos contendo meio MS suplementado com os mesmos antibióticos. Os brotos foram mantidos *in vitro* até a formação de raízes e depois aclimatizadas. As plantas transgênicas produzidas *in vitro* e aclimatizadas (T₀) foram autofecundadas e produziram sementes T₁. Estas sementes foram germinadas e as plântulas T₁ com 14 dias de idade foram selecionadas borrifando solução de 400 mg.L⁻¹ de canamicina, durante 3 dias consecutivos, com observação de plantas cloróticas (não resistentes) no quinto dia. Linhagens T₁ resistentes ao antibiótico foram utilizadas posteriormente para teste de indução do promotor.

4.4.4 Extração de DNA total de Tomateiro Micro-Tom

A extração foi realizada de acordo com Fulton (1995), onde se coletou de 50 mg (aproximadamente de 4 folhas novas) de plântulas de tomate 'Micro-Tom' com 4 semanas. As amostras foram maceradas em microtubo usando nitrogênio líquido. Foi adicionado ao macerado, 750 µL de tampão de extração, preparado com 25 mL de tampão de extração de DNA (0.35 M Sorbitol, 5 mM EDTA; pH 7.5; 0.1 M Tris-base,), 25 mL de tampão de lise nucléica (2%CTAB; 2 M NaCl; 0.2 M Tris, 0.05 M EDTA, ,), 10 mL 5% Sarkosyl e 0,3g bissulfeto de sódio, vortexando ligeiramente.

As amostras foram incubadas a 65°C no banho-maria por 1 hora. Após esse período, foi adicionado 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), em seguida a mistura foi centrifugada a 9.000 g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para novos tubos e adicionado 1 mL de isopropanol gelado, sendo misturados por inversão até

precipitar o DNA. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 9000 *g* por 5 min.

O precipitado formado foi lavado com 1 mL de 70% etanol, e deixado secar em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas em seguida foi ressuscitado com 20 μ L de água. O DNA ressuscitado foi tratado com 10 μ g.mL⁻¹ de RNase A.

O DNA extraído foi quantificado no fluorômetro DyNA Quant 200 (Hoefer), a presença da sequência promotora *SoMT1b* (fragmento ~ 800 pb) no DNA genômico foi confirmada por reações de amplificação. Cada reação continha 20 ng de DNA genômico, 0,1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); 0,2 mM de Mix de dNTPs, 2 mM de MgCl₂ e 0,1 μ M dos iniciadores específico *PP2* e *SoMT1bR2*. A amplificação foi conduzida a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e finalizando a 72°C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de 1% agarose e tampão 1X SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume de 2 μ L de tampão de carregamento contendo *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain* para cada 10 μ L do volume de amostra.

4.4.5 Ensaio de estresse biótico em plantas transgênicas de tomate

Plantas de tomate com 30 dias após a germinação foram expostas a lagartas de *Tuta absoluta*, colocando uma média de seis lagartas por planta. Após 5 dias, as lagartas penetraram nas folhas abrindo galerias transparentes entre a epiderme superior e a inferior, deixando-a com aspecto totalmente reticulado (HAJI et al., 1986). Em seguida, as plantas foram colocadas em tampão de reação, para análise histoquímica da atividade de GUS, como descrito anteriormente no item 4.3.1. Após a retirada da clorofila, as plantas foram analisadas quanto à presença de coloração azul.

4.4.6 Ensaios de estresse por metais pesados em plantas transgênicas de tomate

Nos testes de indutibilidade do promotor por metais pesados, foram realizados dois testes, um utilizando o metal cobre (Cu) e outro utilizando cádmio (Cd). Ambos os testes utilizou-se uma folha de cada planta (linhagem T1), com 30 dias após a germinação, coletada aleatoriamente na planta, foram incubadas em soluções aquosas contendo 50 μM de cobre ou 100 μM cádmio e 1% de Triton X-100. As folhas ficaram submersas nestas soluções, a temperatura ambiente, no escuro por 12 e 24 horas e após este período, as folhas foram colocadas em tampão de reação, para análise histoquímica da atividade de GUS, como descrito anteriormente no item 4.3.1. Após a retirada da clorofila, as plantas foram analisadas quanto à presença de coloração azul.

4.4.7 Ensaios de estresse oxidativo em plantas transgênicas de tomate

Foram conduzidos dois ensaios para verificar a indutibilidade da atividade do promotor por estresse oxidativo, utilizando os herbicidas Paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) e Ametrina [(2-ethylamino)-4-(isopropylamino)-6-(methylthio)-s-triazine]. Uma folha de cada planta (linhagem T1), com 30 dias após a germinação, coletados aleatoriamente na planta, foram incubadas em solução aquosa contendo os herbicidas nas concentrações: 0,38 mg. mL^{-1} e 0,19 mg. mL^{-1} para o Paraquat; 1,59 mg. mL^{-1} e 0,79 mg. mL^{-1} para Ametrina. As folhas ficaram submersas em solução, a temperatura ambiente, por 12 e 24 horas, e após este período as folhas foram colocadas em tampão de reação, para análise histoquímica da atividade de GUS, como descrito anteriormente no item 4.3.1. Após a retirada da clorofila, as plantas foram analisadas quanto à presença de coloração azul.

4.5 Transformação genética de cana-de-açúcar

As transformações genéticas de cana-de-açúcar, via biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*, foram realizados empregando as construções contendo os promotores sintéticos, *4xWbox* [(T)TGAC(C/T)], *4xGCC-like* (AGCCGCC), *4XJERE* (AGACCGCC) e *4xW/4xS-box* [(T)TGAC(C/T)-AGCCACC), clonados no vetor binário de planta *pGPTV GUS-KAN* (RUSHTON et al., 2002), fornecidos gentilmente pelo Prof. Dr. Imre E. Somssich do Instituto *Max-Planck for Plant Breeding*, Alemanha e do promotor de metalotioneína *SoMT1b* (*pKGWFS7::SoMT1b*).

4.5.1 Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar

Para a obtenção de calos embriogênicos foram utilizados explantes de plantas de cana-de-açúcar, cultivares 'IACSP93-3046', 'SP803280' e 'RB835486', com aproximadamente 10 meses de cultivo em campo. Os segmentos do primórdio foliar com 30 - 40 cm foram isolados e submetidos à assepsia com 70% álcool. Em condições assépticas as folhas externas foram retiradas de modo que restassem no máximo os três últimos primórdios foliares. Então, uma região de aproximadamente 10 cm da região meristemática foi seccionada transversalmente em solução de 150 mg.L⁻¹ ácido cítrico. Em seguida, os discos obtidos foram transferidos para meio MSI, composto por meio MS suplementado com 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) e ácido cítrico (Tabela 2). O material vegetal foi mantido à temperatura de 28°C, no escuro e subcultivado em períodos de 15 a 21 dias. Esse processo de indução e multiplicação de calos foi repetido entre 3 e 4 vezes, dependendo de cada cultivar, até que os calos atingissem o estágio embriogênico, ou seja, com aparência globulosa, amarelados e duros (Falco et al., 2000).

Tabela 2 - Composição dos meios de culturas utilizados durante os processos de cultivo *in vitro*, transformação e regeneração de plantas de cana-de-açúcar

	MSI	MCCO	MSRA	MSRB	MSEA	MSEB	MBB
Sais MS (g.L ⁻¹)	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
Vitamina MS (100X, mL.L ⁻¹)	1	1	1	1	1	1	1
Sacarose (g.L ⁻¹)	25	25	25	25	25	25	25
Inositol (g.L ⁻¹)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ácido cítrico (g.L ⁻¹)	0,15	-	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
2,4-D (mg.L ⁻¹)	3	-	-	-	-	-	3
BAP (mg.L ⁻¹)	-	-	0,5	0,5	-	-	-
ANA (mg.L ⁻¹)		0,1					
AIB (mg.L ⁻¹)	-	-	-	-	1,4	1,4	-
Carvão Ativado (MG.L ⁻¹)	-	-	-	-	0,4	0,4	-
Manitol (g.L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	72,88
Sorbitol (g.L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	72,88
Phytigel (g.L ⁻¹)	2,2	2,3	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
Acetosseringona (µM)	-	100	-	-	-	-	-
Timentim (mg.L ⁻¹)	-	-	350	-	350	-	-
Geneticina (mg.L ⁻¹)	-	-	30	30	30	30	-

pH ajustado em 5,8 antes da adição de phytigel. Esterilização em autoclave por 15 min a 127°C (1 atm). Timentim e Geneticina esterilização por filtração (0,25 µm).

4.5.2 Transformação via biobalística

Para a inserção das construções em calos de cana, a preparação das micropartículas e o processo de bombardeamento foram feitos seguindo os passos descritos anteriormente no item 4.3. Para receber as micropartículas carregando as construções contendo os promotores, os calos embriogênicos foram transferidos para meio MBB (Tabela 3) e dispostos num círculo central de 4 cm de diâmetro, 4 horas antes dos disparos. Cada placa recebeu dois disparos com diferença de

angulação de 180 graus. Após 60 min do bombardeamento, os calos foram transferidos para meio MSI (Tabela 3), onde ficaram por 15 dias no escuro.

4.5.3 Transformação de cana-de-açúcar via *Agrobacterium*

Culturas de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA 105) contendo as construções de interesse foram multiplicadas em meio LB líquido (5 mL), suplementado com 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina e 50 mg.L⁻¹ de rifampicina. As culturas foram incubadas a 28°C, num agitador orbital, a 250 rpm, por aproximadamente 16 horas, até que a OD_{600nm} atingisse entre 0,6 e 0,8, sendo este o pré-inóculo. O inóculo foi preparado transferindo-se 150 µL do pré-inóculo para 50 mL de meio LB líquido, suplementado com os mesmos antibióticos do pré-inóculo, e incubado a 28°C pelo período de uma noite, num agitador orbital, a 250 rpm, até atingir a OD_{600nm} de 0,8. A suspensão de *Agrobacterium* foi colocada num tubo tipo falcon e centrifugada a 3000 g, a 10°C durante 15 min. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em meio MS líquido, suplementado com 100 µM de acetosseringona, em volume suficiente para ajustar a OD_{600nm} para 0,3.

Calos embriogênicos de cana-de-açúcar foram colocados na solução de bactéria e deixados sob agitação leve e constante por 15 min. Em seguida os calos foram transferidos para o meio de co-cultivo MCCO (Tabela 2). Para retirar o excesso de agrobactéria, duas folhas de papel filtro (uma de cada vez) foram dispostas sobre os calos embriogênicos e retiradas. Após dois dias de co-cultivo no escuro, a 25°C, os calos foram transferidos para meio MSI (Tabela 2) acrescido de 350 mg.L⁻¹ de Timentim (Ticarcilina dissódica) e mantidos, a 25°C, por 15 dias sob o abrigo da luz.

4.5.4 Regeneração *in vitro* de cana-de-açúcar

Os calos que se encontravam em meio MSI, foram transferidos para os meios de regeneração e seleção, meios MSRA ou MSRB (Tabela 2) para agrotransformação ou biolística, respectivamente, e mantidos sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), a 25°C. Após 3 semanas, o material foi transferido para

novo meio de regeneração e seleção e mantido no fotoperíodo até que tivesse iniciado a diferenciação das folhas. Em seguida, as plântulas foram transferidas para frascos com meio MSEA ou MSEB (Tabela 2) e mantidas na luz para que enraizassem completamente. Plântulas com cerca de 10 cm e com raízes desenvolvidas foram transferidas para vasos de 0,25 L contendo substrato *Plantmax* (Eucatex) umedecido, mantidas por uma semana em câmara úmida para aclimação. Após esse período, as plantas foram levadas para casa de vegetação com luz natural e irrigação 3 vezes ao dia. Após um mês, elas foram acondicionadas em vasos de 5 L e adubadas mensalmente com NPK.

4.5.5 Extração de DNA total de cana-de-açúcar

De acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), um segmento de folha de aproximadamente 100 mg coletado e transferido para um tubo de 2 mL, foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de um bastão de vidro, onde adicionou-se 650 μL de tampão de extração [2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% polivinilpirrolidona 40 (PVP-40); 0,2% β -mercaptoetanol; 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ proteinase K]. O material foi agitado e incubado a 55°C por 1 hora. Foram adicionados 650 μL de solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) gelada, agitou-se o tubo e centrifugou-se a 10.000 g por 5 min. A fase superior foi coletada e levada para novo tubo, ao qual foram acrescentados 200 μL de tampão de extração e foram repetidas as etapas de agitação e centrifugação. A fase superior foi coletada e transferida para novo tubo, seguida de adição de 650 μL de isopropanol gelado, sendo a mistura incubada a -20°C por 30 min. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 μL de etanol 70% ao precipitado. Nova centrifugação foi procedida, a 4°C, por 20 min. A fase líquida foi descartada e o DNA seco ao ar, ressuspendido em 20 μL de TE com 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de RNase A e incubado a 37°C por 15 min.

O DNA extraído foi quantificado no fluorômetro DyNA Quant 200, a presença da sequência promotora *SoMT1b* (fragmento ~ 800 pb) no DNA genômico foi confirmada por reações de amplificação. Cada reação continha 20ng de DNA genômico, 0,1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); Tampão 1 X; 0,2 mM de Mixde dNTPs, 2 mM de MgCl_2 e 0,1 μM dos iniciadores específico *PP2* e

SoMT1bR2, para as construção *pKGWFS7::SoMT1b* e para as construções com os promotores sintético iniciadores do *nptII*, forward (5' GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3') e reverse (5' ATCGGGAGCGGCGATACCGTA 3'). A amplificação foi conduzida a 94°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e finalizando a 72°C por 5 min. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de 1% agarose e 1X tampão SB. A cada uma das amostras foi adicionado um volume de 2 µL de tampão de carregamento contendo *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain* para cada 10 µL do volume de amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Promotores sintéticos

Promotores sintéticos contendo apenas elementos-cis de interesse têm sido estudados com objetivo de aplicações biotecnológicas (RUSHTON et al., 2002). Alguns promotores induzidos por ataque de agentes bióticos já foram caracterizados e contem elementos-cis específicos, como ‘GCG-like’ (OHME-TAGAKI et al., 2000); ‘W boxes’ (RUSHTON et al., 1996; EULGEM et al., 2000) e ‘JERE’ (AGACCGCC) (MENKE et al., 1999). O uso de promotores sintéticos é uma abordagem relevante para amplificação do sinal de ataque de agentes bióticos, permitindo uma expressão direcionada do gene desejado (RUSHTON et al., 2002; HEIL, 2009).

Com base nessas informações, quatro construções contendo os promotores sintéticos, 4X W-box [(T)TGAC(C/T)], 4X GCC-like (AGCCGCC), 4X JERE (AGACCGCC) e 4xW/4xS-box [(T)TGAC(C/T)-AGCCACC) (Figura 2), foram usadas na transformação por eletroporação de *Agrobacterium tumefaciens*. Para confirmação da inserção dos vetores, o DNA plasmidial extraído de colônias isoladas foi amplificado para detecção do gene nptII, resistência a canamicina, presente nos vetores inseridos. Todas as amostras foram confirmadas apresentando fragmento do tamanho esperado de 700 pb (não mostrado).

Figura 2 - Esquema representativo do vetor de expressão pGPTV-GUS-KAN desenvolvido por Rushto et al., 2002. Os promotores sintéticos foram inseridos entre os sítios das enzimas de restrição *SpeI* e *XbaI*, a montante da sequência mínima do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor.

5.1.1 Análise de expressão do gene *uidA* em calos de cana-de-açúcar dirigida por promotores sintéticos

Para verificar se as construções dos promotores contendo os elementos-cis W-box, GCC-like, W/S-box e JERE eram capaz de dirigir a expressão do gene repórter *uidA* (GUS) em cana-de-açúcar, foram realizados dois ensaios de expressão empregando calos de cana-de-açúcar provenientes de cultura *in vitro* após bombardeamento. A expressão do gene repórter pode ser visualizada de forma restrita (Figura 3), pela presença de regiões de coloração azul.

Estes resultados indicaram uma funcionalidade limitada destes promotores em cana-de-açúcar. A baixa eficiência da expressão do gene repórter *uidA*, pode ser atribuída a presença do promotor mínimo de 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), que em dicotiledôneas é altamente ativo, porém em estudos relatados com cana, apresenta baixo níveis de expressão dos transgenes (CHRISTENSEN; QUAIL, 1996; Wei et al. 2003). Após estes resultados iniciais, as construções sintéticas foram testadas em experimentos de expressão estável em cana-de-açúcar.

Figura 3 - Análise histoquímica da atividade transiente do gene repórter *uidA*, em calos de cana, sob controle de sequências promotoras contendo elementos-cis sintéticos. A e B: Promotor 4x W1-GUS; C e D: Promotor 4x GCC-GUS; E e F: Promotor 4x JERE-GUS; G e H: Promotor 4x W2/4xS-GUS; I e J: Controle negativo. Setas indicam regiões de expressão de GUS

5.1.2 Transformação genética de cana-de-açúcar com promotores sintéticos

Com o objetivo de avaliar a atividade dos promotores sintéticos, dirigidos pela sequência mínima do promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve flor (CaMV) (RUSHTON et al., 2002), foram realizados seis experimentos de transformação das cultivares 'RB83 5486', 'SP80 3280' e 'IACSP93 3046' (Tabela 3). Foram utilizados dois métodos para inserção do DNA exógeno em plantas: transformação mediada por *Agrobacterium* (HOEKEMA et al., 1983), e transferência direta de genes por meio de bombardeamento de micropartículas (KLEIN et al., 1987).

Após a transformação dos calos, estes foram selecionados quanto à resistência do gene *nptII* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase II, conferindo resistência a antibióticos tais como canamicina, neomicina, geneticina, e paromomicina (GHANEM, 2011). Nas transformações mediadas por *Agrobacterium*, utilizou-se o antibiótico Timentin (Ticarcilina dissódica) em todo o processo de seleção e regeneração das plantas para conter o crescimento das agrobactérias.

Tabela 3 - Experimentos de transformação de cana-de-açúcar com o vetor contendo os promotores sintéticos, controlando a expressão do gene repórter *uidA* (GUS)

Experimento	Cultivar	Método de Transformação	Promotor	Nº calos transformados	Nº Plantas regeneradas
1	RB 83 5486	Bombardeamento	W-Box	80	26
			GCC-like	70	15
			JERE	63	-
			W/S – Box	58	9
			Controle	25	8
2	IAC 93 3046	Bombardeamento	W-Box	96	-
			GCC-like	106	-
			JERE	95	-
			W/S – Box	107	-
			Controle	56	-
3	SP 80 3280	Bombardeamento	W-Box	78	-
			GCC-like	84	-
			JERE	72	-
			W/S – Box	82	-
			Controle	48	-
4	SP 80 3280	<i>Agrobacterium</i>	W-Box	234	125
			GCC-like	253	31
			JERE	198	9
			W/S – Box	219	1
			Controle	90	3
5	SP 80 3280	<i>Agrobacterium</i>	W-Box	90	-
			GCC-like	90	-
			JERE	90	-
			W/S – Box	90	-
			Controle	90	-
6	IAC 93 3046	Bombardeamento	W-Box	90	-
			GCC-like	90	-
			JERE	90	-
			W/S - Box	90	-
			Controle	90	-

Em quatro experimentos (ensaios 2, 3, 5 e 6) de transformação genética, via biobalística ou por meio de *Agrobacterium tumefaciens* (Tabela 3), não houveram plantas regeneradas, pois os calos utilizados não resistiram à seleção com antibiótico geneticina (35 mg.L⁻¹), indicando a não inserção do gene no DNA genômico de cana.

As cultivares ‘RB 83 5486’ e ‘SP 80 3280’, com os quais se utilizou, respectivamente, biobalística e agrotransformação como métodos de transformação, em dois experimentos distintos (Tabela 3), regeneraram plantas tolerantes a geneticina, num total de 225 plantas. Estas então foram analisadas para atividade do gene GUS por meio de ensaio histoquímico com as folhas mais jovens de cada planta (não mostrado). Nenhuma coloração correspondente à atividade GUS foi

observada, podendo ser atribuído ao baixo nível de expressão dos transgenes inseridos, mediados pela sequência mínima do promotor *CaMV* 35S. Em alguns casos, é necessária a seleção de centenas de linhagens transformantes para obtenção de uma capaz de apresentar altos níveis de expressão do transgene (WEI et al., 2003).

Em função dos resultados obtidos, conduziu-se a confirmação dos eventos de transformação através da amplificação da sequência do gene *nptII*, e foi constatando a não inserção dos genes no genoma de nenhuma das plantas analisadas. Dessa forma, as plantas foram consideradas escapes, ou seja, plantas regeneradas em meio seletivo contendo geneticina, mas que não foram confirmadas por PCR para o gene *nptII*. Melotto-Passarin (2009) e Barbosa (2010) relatam altas taxas de escapes em experimentos de transformação de calos de cana por biobalística com seleção por geneticina.

5.2 Desenvolvimento de promotores endógenos de metalotioneínas e inclusão de motivos sintéticos

As sequências promotoras de metalotioneínas (MTs) apresentam um potencial de aplicação no desenvolvimento de canas transgênicas, podendo modular a expressão de um gene de interesse sob influência de fatores exógenos ou endógenos específicos (SERENO, 2009), além de apresentarem altos níveis de expressão em alguns tecidos (FIGUEIRA et al., 2001). A caracterização destas sequências contribui para o entendimento da regulação da expressão gênica.

Para a transformação genética de plantas foram planejadas três construções baseadas no vetor pKGWFS7, do sistema de clonagem Gateway, desenvolvido para facilitar a construção de vetores através de um sistema de recombinação em um processo de duas etapas (MARSISCHKY; LABAER, 2004).

O vetor de expressão pKGWFS7 do sistema Gateway foi escolhido, por possuir os genes repórter *Egfp* da proteína Green Fluorescence Protein (GFP) e *uidA* da enzima β -glucuronidase (GUS) sob o controle de promotor a ser inserido no vetor e gene de seleção em planta *nptII* controlado pelo promotor *nopalina sintase* (nos) conferindo resistência a canamicina (KARIMI et al., 2002).

Devido a baixa ou ausência de expressão utilizando o promotor mínimo *CaMV 35S* optou-se por testar a inclusão do elementos-cis sintéticos no promotor do gene de metalotioneína *SoMT1a* e os efeitos de regulação pela adição dos elementos regulatórios. Baseado nas análises das sequências apresentadas por SERENO (2009), optou-se por adicionar os elementos-cis WKRY e JERE, por não ter sido constatado a presença deste elementos na sequência original do promotor *SoMT1a*.

Para avaliar em cana-de-açúcar os elementos-cis regulatórios sintéticos WRKY (RUSHTON et al., 1996; EULGEM et al., 2000) e JERE (MENKE et al., 1999), adicionados a região promotora de metalotioneína (SERENO, 2009), foram projetados iniciadores específicos. Estes iniciadores eram complementares à porção 5' da sequência do promotor *SoMT1a* (*forward*) e à porção 5' do iniciador foram adicionados nucleotídeos correspondentes aos elementos-cis regulatórios.

As regiões promotoras de metalotioneínas, *SoMT1a* e *SoMT1b*, identificadas e clonadas em vetor pGEM-T Easy por Sereno (2009), foram utilizadas como molde para a montagem das construções utilizadas para transformação de plantas. Foi realizada a amplificação por PCR do promotor *SoMT1b*, obtendo fragmentos de aproximadamente 800 pares de base (pb) (Figura 4B).

Para as construções contendo promotores sintéticos, ou seja, os elementos-cis regulatórios W-box (TTGACC) e JERE (AGACCGCC) adicionados por PCR ao promotor *SoMT1a*, foram utilizados os iniciadores *forward* específicos *WRKY/SoMT1a* e *JERE/SoMT1a*. Os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado de aproximadamente 900 pares de base (Figura 4A). Os fragmentos amplificados foram isolados em gel de agarose e purificados, para clonagem em vetores de expressão.

Figura 4 – Produtos de amplificação correspondente aos promotores *WRKY/SoMT1a*, *JERE/SoMT1a* e *SoMT1b*, a partir de clones dos promotores endógenos *SoMT1a* e *SoMT1b* (SERENO, 2009). Amplificados com os iniciadores específicos para cada construção. A: promotor *SoMT1a* com a inserção dos elementos-cis regulatórios *WRKY* e *JERE*. M: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas), C: controle negativo. B: Promotor *SoMT1b*, M: marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas), C: controle negativo

Os promotores contendo os elementos-cis regulatórios W-Box e JERE adicionados ao promotor *SoMT1a*, obtidos por PCR (*WRKY/SoMT1a* e *JERE/SoMT1a*) e o promotor *SoMT1b*, foram ligados ao vetor de entrada pCR8 e inseridos, por eletroporação, em *E. coli* linhagem DB3.1. Os plasmídeos obtidos foram então digeridos e os produtos dessas reações avaliados através em gel de agarose (Figura 5), onde se observa a liberação dos fragmentos com os tamanhos esperados: 1089 pb para a construção *WRKY/SoMT1a*, 499 pb para *SoMT1b* e fragmentos de 858, 532 e 326 pb para *JERE/SoMT1a*. A presença de pelo menos um clone com o padrão de digestão esperado indica o sucesso da clonagem dos fragmentos promotores no vetor de entrada.

Figura 5 - Análise da digestão enzimática do vetor pCR8 contendo os fragmentos promotores *SoMT1a*, acrescido do elemento-cis regulatório W1/2 box - *WRKY/SoMT1a* (A) e JERE box - *JERE/SoMT1a* (B). As amostras foram separadas em géis de agarose 1%, corado com *SYBR Gold*. M₁: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas); M e M₂: marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas). As setas indicam os clones com o padrão de digestão esperado

A partir das evidências obtidas com a digestão enzimática, clones contendo cada um dos promotores foram submetidos ao sequenciamento para confirmação do processo de clonagem e das sequências clonadas. As sequências foram alinhadas com auxílio da ferramenta *Multiple Sequence Alignment ClustalW*, obtendo uma sequência consenso para cada promotor e estas foram submetidas a análise comparativa com suas respectivas sequências esperadas (montadas *in silico*, no caso daquelas compostas por elementos regulatórios sintéticos). O resultado completo destes alinhamentos é apresentado nas nos Apêndices A, B e C.

A análise das sequências obtidas dos clones contendo o fragmento promotor *SoMT1b* (Apêndice A) e as construções *WRKY/SoMT1a* (Apêndice B) e *JERE/SoMT1a* (Apêndice C) comparadas com suas respectivas sequências esperadas, demonstram a correta inserção dos fragmentos no vetor de entrada. Para as construções *WRKY/SoMT1a* (Figura 6) e *JERE/SoMT1a* (Figura 7), o sequenciamento também confirmou a inserção dos elementos-cis regulatórios, W boxes (TTGACC) e JERE (AGACCGCC), respectivamente, no início da sequência promotora *SoMT1a*.

A sequência consenso obtida para o promotor *SoMt1b*, apresenta 95% de identidade quando comparada com a sequência esperada isolada por Sereno (2009), *WKRY/SoMT 1a* e *JERE/SoMT1a* apresentaram uma identidade de 99% e 98%, respectivamente, em relação às sequências esperadas.

WRKY_SoMT1a	1	AAGCTTT TTGACC ACTATAGGGCACGCGTGGTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGAT
WRKY_SoMT1a_esperada	1	AAGCTTT TTGACC ACTATAGGGCACGCGTGGTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGAT
WRKY_SoMT1a	61	GCGAGGAAGTTCTCACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAAT
WRKY_SoMT1a_esperada	61	GCGAGGAAGTTCTCACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAAT
WRKY_SoMT1a	121	GGTACATCATAAAAGAAGCTGAAGATTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTC
WRKY_SoMT1a_esperada	121	GGTACATCATAAAAGAAGCTGAAGATTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTC

Figura 6 - Destaque do alinhamento da sequência consenso obtida para o promotor *WRKY/SoMT1a*, clonado no vetor de entrada pCR8, com a sequência esperada (molde) montada *in silico*, com base na sequência isolada por Sereno (2009), acrescida do elemento-cis regulatório W boxes (TTGACC), A região em destaque apresenta a localização dos elementos *WRKY*, confirmando sua presença no promotor *WRKY/SoMT1a*

JERE_SoMT1a	1	TCGCGTAGTA GAGCGGCAGCT GAGTTTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGCTCGATGCGA
JERE_SoMT1a_esperada	1	ACGCGTGGTA GACCG---- CCAGCTTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGATGCGA
JERE_SoMT1a	61	GCAGGTTCTCCACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGACCAGCAATGGTA
JERE_SoMT1a_esperada	57	GGAAGTTCTCACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAATGGTA
JERE_SoMT1a	121	CATCATAGAAGAAGATGAAGATTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCT
JERE_SoMT1a_esperada	117	CATCATAAAAGAAGCTGAAGATTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCT

Figura 7 - Destaque do alinhamento da sequência consenso obtida para o promotor *JERE/SoMT1a*, clonado no vetor de entrada pCR8, com a sequência esperada montada *in silico* com base na sequência isolada por Sereno (2009), acrescida do elemento-cis regulatório JERE (AGACCGCC). A região em destaque apresenta a localização dos elementos JERE, confirmando sua presença no promotor *JERE/SoMT1a*

A partir das evidências da correta inserção das sequências promotoras no vetor de entrada pCR8, as construções foram submetidas à reação de recombinação com o vetor de expressão pKGWFS7. As construções pKGWFS7::*SoMT1b*, pKGWFS7::*JERE/SoMT1a* e pKGWFS7::*WRKY/SoMT1a*, foram utilizadas na eletroporação da linhagem DB3.1 de *E. coli*. O primeiro indicativo confirmando a recombinação dos vetores foi a presença de colônias bacterianas, pois a incorporação do inserto acontece com a extrusão do gene letal *ccdB*. O produto deste gene é uma DNA girase letal para a maioria das linhagens de *E. coli*, inclusive a DB3.1 (DAFNY-YELIN; TZFIRA, 2007).

Após a extração do plasmídeo de colônias isoladas, as construções foram confirmadas por meio de reação de PCR, utilizando iniciadores que se anelam a parte do gene *uidA* e geram um fragmento de 366 bp. Com este resultado o processo de clonagem de todos os fragmentos promotores no vetor de destino foi confirmado (Figura 8).

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Gold* dos fragmentos (366 pb) amplificados do gene *uidA* confirmando as construções: *SoMT1b* (1 e 2), controle positivo CaMV (pCAMBIA1303) (3), *JERE/SoMT1a* (4) e *WKRY/SoMT1a* (5). C: controle negativo, M: marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas)

5.2.1 Análise qualitativa em epitélio de cebola

Para avaliar se a sequência promotora *SoMT1b* seria capaz de dirigir a expressão dos genes repórteres e para avaliar o efeito da inserção de sequências regulatórias sintéticas (W box e JERE) sobre a atividade de *SoMT1a*, foram

realizados experimentos de expressão transiente em células de epitélio de cebola. Estudos de expressão transiente representam abordagem relevante para a determinação da atividade do promotor (GHOSH-BISWAS, 2006).

Esta é uma técnica amplamente utilizada como primeira validação de sequências promotoras, tendo sido empregada com sucesso para validar regiões promotoras como do promotor do gene *CHI* (chalcona isomerase) de *Malus sp.* (TIAN et al., 2011) e do promotor do gene *mustang* de cana-de-açúcar (KAJIHARA et al., 2012). Wenck et al. (2003), em seu estudos demonstra a emissão de diferentes proteínas fluorescentes, entre elas a da GFP, sob comando do promotor do vírus Cestrum (CMP), sendo possível visualizar células individualmente transformadas.

Após o bombardeamento, os epitélios de cebola foram analisados quanto à emissão de fluorescência (GFP) em microscópio confocal e estes mesmos epitélios foram utilizados em ensaio histoquímico da enzima β -glucoronidase (GUS). A capacidade do promotor *SoMT1b* em dirigir a expressão dos genes repórteres foi demonstrada, pela emissão de fluorescência (GFP) e presença de coloração azul (GUS) (Figura 9), sugerindo a funcionalidade destes fragmentos promotores e a possibilidade de aplicação em transformação estável de cana-de-açúcar.

Entretanto, nos experimentos com as construções contendo os elementos sintéticos (WRKY e JERE) acrescentados à região promotora *SoMT1a*, não foi verificada a emissão de fluorescência e/ou presença de coloração azul (dado não mostrado), dificultando a validação da funcionalidade destes promotores. Os testes realizados com epitélio de cebola foram repetidos três vezes e os resultados permaneceram semelhantes em todas as repetições. As variáveis técnicas foram avaliadas, não havendo razões para este resultado inesperado. Desta forma, capacidade de dirigir a expressão do gene repórter foi comprovada apenas para o promotor *SoMT1b*.

Uma possível explicação, seria que o promotor *SoMT1a* poderia ser uma região promotora não funcional, a adição dos elementos cis responsivos não teria efeito algum sobre o promotor se este for inativo. Segundo Yang et al. (2003), o isolamento de promotores a partir de uma planta altamente poliplóide, como a cana de açúcar, tem um alto risco de isolamento de um promotor não funcional a partir de uma cópia inativa do gene.

Figura 9 - Análise da atividade dos promotores *SoMT1b* (linhas 1 e 2), CaMV35S (controle positivo, linha 3) e controle negativo (linha 4) na regulação da expressão de GFP (a) e GUS (b) em epitélios de cebola. Imagens de GFP com aumento de 20x e de GUS com aumento de 10x

5.2.2 Análise funcional do promotor *SoMT1b* em plantas de Tomate cv 'Micro-Tom'

A cultivar 'Micro-Tom' de tomate, gerada inicialmente para fins ornamentais (SCOTT; HARBAUGH, 1989), vem sendo usada para estudos genéticos e fisiológicos (DAVID-SCHWARTZ et al., 2001; WANG et al., 2005) por apresentar tamanho reduzido, podendo ser cultivada em estruturas pequenas de laboratório, apresentar ciclo de vida curto, que varia de 80 a 90 dias (PERES et al., 2001), e produzir frutos e sementes viáveis em vasos (ANGELO, 2007).

Nos estudos da atividade do promotor de metalotioneína, o cultivar 'Micro-Tom' foi submetido à transformação estável via *Agrobacterium tumefaciens*, com as construções pKGWFS7::SoMT1b e com o vetor pCAMBIA 2301 como controle, por conter o promotor *CaMV35S* controlando a expressão do gene *uidA*. Foram obtidas plantas transgênicas para ambas as construções.

As plantas T₁, ainda em heterozigose, provenientes da autofecundação dos transformantes (T₀) foram selecionadas quanto à resistência ao antibiótico canamicina (400 mg.L⁻¹). Folhas das plantas que sobreviveram ao desafio com antibiótico foram coletadas e submetidas à extração de DNA total. A confirmação dos eventos de transformação foi realizado através da amplificação com os iniciadores *PP2* (*forward*) e *SoMT1bR2* (*reverse*), foi averiguada a presença de fragmento de ~800 pb, correspondente à da sequência do promotor *SoMT1b* (Figura 10).

Figura 10 – Amplificação da região promotora do gene *SoMT1b* em DNA genômico de Tomateiro 'Micro-Tom'. Análise do promotor *SoMT1b*; Plantas controle transformadas com pCAMBIA2301, *CaMV35S* (1-6); Plantas transformadas com pKGWFS7::*SoMT1b* (7-20); Planta não transformada (21-24); Controle positivo com plasmídeo (P); Controle negativo de reação (C); Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas) (M). Fragmento de ~800 pb (seta). Gel 1% agarose

Em função dos resultados obtidos por PCR, as plantas consideradas positivas foram utilizadas em ensaios para avaliar a atividade, o padrão espacial-temporal e a indutibilidade do promotor *SoMT1b*, visando realizar uma caracterização da região promotora. Segundo Sereno (2009), a expressão das metalotioneínas pode estar relacionada com estresses, etapas do desenvolvimento da planta e apresenta expressão tecido específica.

5.2.2.1 Estudo do padrão temporal da atividade do promotor *SoMT1b*

Para o estudo do padrão temporal da atividade do promotor *SoMT1b*, as plantas de tomate resistentes ao antibiótico, 16 transformantes T1, foram submetidas a análises histoquímicas em vários estágios de desenvolvimento. Inicialmente, plantas foram analisadas 14 dias após a germinação e apenas a planta controle contendo o promotor *CaMV 35S* dirigindo a expressão do gene repórter *uidA* apresentou coloração azul em todas as partes analisadas da planta (Figura 11A e 11B). As plantas transformadas com a construção contendo o fragmento promotor *SoMT1b* e o controle não transformado, não apresentaram coloração azul aparente. O mesmo foi observado em plantas analisadas 21 dias após a germinação (Figura 11C e 11D).

Figura 11 - Análise histoquímica de plantas de tomate transgênico contendo o gene repórter *uidA* sob controle da sequência promotora do gene de metalotioneína *SoMT1b* e CaMV35S (controle). A: Plantas analisadas 14 dias após a germinação; B: Folhas das plantas de 14 dias; C: Plantas analisadas 21 dias após a germinação; D: Folhas das plantas de 21 dias. 1 – promotor *SoMT1b*, 2- CaMV35S, 3- Controle não transformado. A presença de coloração azul foi notada apenas nas plantas controle CaMV35S

Os ensaios histoquímicos também foram realizados com flores, botões florais e frutos das plantas transformadas. A Figura 12 evidencia que em flores e botões florais, a expressão do gene repórter (presença de coloração azul) foi observada apenas nas plantas controle contendo o promotor *CaMV 35S*.

Figura 12 - Análise histoquímica de flores (1a, 2a, 3a) e botões florais (1b, 2b, 3b) de plantas transgênicas de tomateiro 'Micro-Tom' contendo o gene repórter *uidA* sob controle das sequências promotoras *CaMV35S* (1a e 1b), *SoMT1b* (2a e 2b) e controle não transformado (3a e 3b). A presença de coloração azul foi notada apenas nas plantas controle *CaMV35S*

A atividade do promotor *SoMT1b* foi comprovada em tomate apenas em testes realizados com frutos (Figura 13). A atividade do promotor *CaMV35S* também foi observado neste órgão. A expressão do gene *uidA* foi notada tanto nos frutos quanto nas sementes e também em alguns embriões e em intensidade semelhante para ambos os promotores (Figura 13).

A sequência promotora *SoMT1b* apresenta elementos-cis que estariam envolvidos no controle da expressão gênica especificamente em semente e fruto, que atuando em sinergia promovem a regulação da expressão direcionada, estimulando a transcrição tanto no endosperma como no embrião. O promotor contém quatro cópias do motivo específico de pólen *POLLEN1LELAT52* (BATE; TWELL, 1998) e motivos observados em genes que codificam proteínas de armazenamento em semente: quatro repetições dos elementos-cis *CAATBOX1* (SHIRSAT et al., 1989) e *EBOXBN-NAPA* (STALBERG et al., 1996) e duas repetições do elemento *CANBNNAPA* (ELLER-STROM et al., 1996).

Figura 13 - Análise histoquímica de sementes de plantas transgênicas de tomateiro 'Micro-Tom' contendo o gene repórter *uidA* sob controle das sequências promotoras CaMV35S (1a e 1b), *SoMT1b* (2a e 2b) e controle não transformado (3a e 3b). Notar a expressão do gene repórter sendo controlada por *SoMT1b* em intensidade semelhante ao CaMV35S. Na imagem 2c pode-se visualizar o embrião expressando o gene GUS

Estudos com promotores contendo o elemento-cis promotor (*CANBNNAPA*) isolado, utilizados na transformação gênica de *Nicotiana tabacum*, sugerem que os fatores de transcrição e as suas sequências de ligação estão parcialmente conservados nas dicotiledôneas e monocotiledôneas (ELLERSTRÖM, 1996). Stalberg et al. (1996) demonstrou a expressão de genes de proteínas de reserva nas sementes de *Brassica napus* em três tecidos principais: o endoesperma, o embrião e a camada de aleurona, estas proteínas são importantes nas sementes, pois garantem o suprimento de carbono e nitrogênio durante a germinação até que a planta tem a capacidade de realizar fotossíntese.

Desta forma, fica demonstrado que o fragmento promotor *SoMT1b* de cana-de-açúcar é capaz de dirigir a expressão gênica também em plantas de tomate, direcionando a expressão do gene repórter durante o desenvolvimento de frutos, sementes e embriões.

5.2.2.2 Estudo da indutibilidade do promotor *SoMT1b* por estresse biótico e abiótico

As regiões promotoras dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar podem responder a diversos estímulos, tendo sido demonstrada sua resposta a estresse biótico e abiótico (SERENO, 2009). Evidências indicam uma relação das MT na resposta a patógenos, associadas à proteção contra espécies reativas de oxigênio (CHOI et al., 1996) e envolvimento na homeostasia de metais essenciais, como zinco e cobre, provavelmente associadas com transporte de metais (COZZA et al., 2006).

Além disso, a sequência promotora *SoMT1b* contém 4 tipos de elementos-cis pertencentes à família de fatores de transcrição W-Box [(T) TGAC (C / T)]. Esta classe de elementos-cis podem estar associados com a indutibilidade por patógenos e induzida por elicitores fúngicos (EULGEM et al., 1999; RUSHTON et al., 2002). As sequências que flanqueiam o elemento invariável ('TGAC') são responsáveis pela especificidade do elemento, normalmente atuam em sinergia e se encontram agrupados em um pequeno trecho da região promotora (EULGEM et al., 2000).

Dessa forma, para a análise dos padrões de indutibilidade do promotor *SoMT1b* em plantas transgênicas de tomate, foram realizados experimentos de estresse por metais, herbicidas e ataque de praga (herbivoria).

Das plantas analisadas após exposição à herbivoria, apenas as plantas controle, contendo o promotor *CaMV 35S* dirigindo a expressão de GUS, apresentaram coloração azul (Figura 14). Apesar da presença dos elementos-cis responsivos a herbivoria no promotor *SoMT1b*, este não se mostrou capaz de responder a este tipo de estímulo, indicando que o promotor de metalotioneína *SoMT1b*, não apresenta indução do por herbivoria.

Figura 14 - Análise histoquímica de plantas transgênicas de tomate contendo o gene repórter *uidA* sob controle das sequências promotoras CaMV35S (pCAMBIA2301), *SoMT1b* e controle não transformado, submetidas à herbivoria. Não foi observado efeito da herbivoria sobre a expressão de GUS

Nos ensaios de indutibilidade por metais, as folhas das plantas transformadas com o promotor de metalotioneínas e controle não transformado não apresentaram coloração azul (Figura 15). A coloração foi detectada em todos os tratamentos com cádmio, mas apenas nas plantas controle contendo o promotor *CaMV 35S* (pCAMBIA 2301). Já nos tratamentos com cobre, a coloração azul foi detectada somente no tratamento com solução de 50 μM por 12 horas e somente nas folhas das plantas com promotor controle (*CaMV 35S*). A ausência de expressão do gene *uidA* controlado pelo promotor *CaMV 35S* nos demais tratamentos (50 μM por 24 horas, 100 μM por 12 e 24 horas) pode estar relacionada com a toxicidade do metal, que afeta a expressão do gene, referente a enzima catalase, a nível pós-transcricional (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

Figura 15 - Análise histoquímica de folhas de tomateiro Micro Tom transgênicos, contendo o gene repórter *uidA* sob controle das sequências promotoras CaMV35S (folhas 1), *SoMT1b* (folhas 2) e controle não transformado (folhas 3), tratadas com cádmio e cobre

Entre os elementos-cis regulatórios observados na sequência promotora de *SoMT1b* está o CuRE (GTAC), presente uma única vez. Em estudos de co-transformação com *Chlamydomonas* observou-se que este elemento-cis é uma região reguladora do gene *Cyc6*, podendo estar envolvido na resposta a metais (QUINN et al., 2000; KROPAT et al., 2005).

Segundo Quinn et al. (2002) o grau de ativação do promotor em resposta a metais está relacionada com a presença de mais de um elemento cis-regulatório, como o elemento HyRe, que apresenta um núcleo regulatório comum (GTAC) ao CuRE, mas com funções distintas, a diferença funcional entre estes dois elementos pode estar relacionada com as sequências de nucleotídeos que flanqueiam o núcleo do elemento regulatório. Desta forma, o promotor *SoMT1b* pode não responder a metais apenas de forma, o promotor *SoMT1b* pode não responder a metais, apresentando apenas um elemento-cis responsivo.

Adicionalmente aos testes feitos com íons metálicos, foram realizados estudos utilizando os herbicidas Paraquat (N,N'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) e Ametrina ((2-ethylamino)-4-(isopropylamino)-6-(methylthio)-s-triazine). O objetivo destes experimentos era verificar se as metalotioneínas têm papel na remoção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteção das células do dano produzido pelo estresse oxidativo (SERENO, 2009).

A ametrina é um herbicida que age inibindo a cadeia transportadora de elétrons no fotossistema II (PSII), através do bloqueio da transferência de elétrons, podendo elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SOUZA et al., 2012). Por outro lado, o paraquat age nas plantas como umceptor de elétrons do fotossistema I (PSI), tornando-se monocation, que é rapidamente oxidado para paraquat²⁺ e concomitante acontece a redução de oxigênio para superóxido (BABBS; PHAM; COOLBAUGH, 1989). Quando os níveis intracelulares de superóxido excedem a capacidade de defesa celular, se tem o estresse oxidativo, que pode causar danos a várias macromoléculas, tais como lípidos, proteínas, DNA e RNA, podendo conduzir à morte do tecido (SOUZA et al., 2012; PETERS, 2011; ZHAO et al., 2012).

Os ensaios foram muito semelhantes à queles com íons metálicos, utilizando duas concentrações e dois tempos de tratamento. Para ambos os herbicidas, a coloração azul, indicando a expressão do gene repórter GUS, só foi observada na construção controle, contendo o promotor *CaMV 35S* (Figura 16). Indicando que talvez esse promotor de metalotioneína não apresente função específica em resposta a situações de estresse oxidativo.

Figura 16 - Análise histoquímica de folhas de tomateiro Micro Tom transgênicos, contendo o gene repórter *uidA* sob controle das sequências promotoras *CaMV35S* (folhas 1), *SoMT1b* (folhas 2) e controle não transformado (folhas 3), tratadas com ametrina ou paraquat. A coloração azul foi observada apenas nas folhas das plantas transformadas com o promotor controle *CaMV35S*

Segundo Rushton et al. (2002), promotores com múltiplas cópias de um mesmo elemento regulador são mais fortes do que aqueles com apenas uma ou duas cópias. Assim, a presença de apenas uma única cópia do elemento CuRE na sequência do promotor *SoMT1b* seria insuficiente para a indução por estresses abióticos.

5.2.3 Transformação genética de cana-de-açúcar

Com o objetivo de verificar a atividade do promotor de metalotioneína em cana-de-açúcar, foram realizados oito experimentos de transformação genética das variedades 'SP803280' e 'IACSP93-3046', utilizando a construção pKGWFS7::SoMTb, via biobalística (Tabela 4).

Em dois experimentos, todos os calos transformados foram submetidos a ensaio histoquímico de expressão transiente do gene repórter *uidA* (GUS) e em outro experimento apenas parte dos calos foram utilizados para análise de expressão transiente. Todos os calos dos outros seis experimentos foram utilizados para transformação estável de cana-de-açúcar (Tabela 4).

Tabela 4 - Experimentos de transformação genética de cana-de-açúcar para caracterização do promotor de metalotioneína *SoMT1b*.

Experimento	Cultivar	Promotor	Nº calos bombardeados	Nº plantas regeneradas
1	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	50 25	Expressão transiente
2	SP 80 3280	SoMT1b Controle	180 90	10 3
3	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	180 90	- -
4	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	180 90	15 7
5	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	180 90	50 7
6	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	180 90	- -
7	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	50 25	Expressão transiente
8	IAC 93 3046	SoMT1b Controle	180 90	- 3

5.2.3.1 Análise de expressão transiente em calos de cana-de-açúcar

Após os resultados preliminares de transformação transiente de epitélio de cebola, a construção contendo o fragmento promotor *SoMT1b* foi analisada em ensaios de expressão transiente em calos de cana-de-açúcar.

Foi realizada a análise histoquímica para visualização da expressão do gene repórter em calos de três experimentos (1, 3 e 7, Tabela 4). No experimento 3, somente a metade dos explantes foram utilizados no ensaio histoquímico, já nos experimentos (1 e 7), todos os calos foram analisados. No entanto, poucos calos e apenas do primeiro experimento apresentaram pontos com coloração azul (Figura 17) e, em muitos casos, a coloração era muito mais fraca quando comparada com a observada para o promotor da ubiquitina - controle (dado não mostrado). Além disso, o número de pontos azuis nos calos transformados com o promotor da ubiquitina era muito superior ao observado para nos calos com o promotor *SoMT1b* (Figura 17).

Figura 17 - Análise histoquímica evidenciando a expressão do gene repórter *uidA*, em calos de cana, sob controle da sequência promotora de metalotioneína *SoMT1b* (A, B e C); D: Controle negativo; E: Controle positivo (promotor da ubiquitina de milho). Setas indicam pontos de expressão de GUS.

A grande diferença no tamanho dos vetores *pKGWFS7::SoMT1b* e *pUBILN* empregados na transformação dos calos, pode ter sido a causa da menor eficiência de transformação observada para a construção com o promotor *SoMT1b*.

O tamanho dos vetores também não foi considerado no momento da preparação das micropartículas, tendo sido utilizada a mesma quantidade de DNA (10 µg) dos dois plasmídeos, entretanto há uma grande diferença no tamanho dos

vetores, o vetor pKGWFS7::SoMT1b (12 kb) tem 2,4 vezes o tamanho do vetor pUBILN (5kb). Segundo Altpeter et al. (2005), quanto maior o tamanho do vetor utilizado na transformação por biobalística, maior a dificuldade de incorporação do transgene no genoma vegetal, dificultando a obtenção transformantes

No entanto, os resultados obtidos são suficientes para confirmar que o fragmento promotor *SoMT1b* é ativo e capaz de dirigir a expressão gênica em cana-de-açúcar.

5.2.3.2 Transformação estável calos de cana-de-açúcar

Após a transformação dos calos de cana, plântulas foram regeneradas e selecionadas quanto à resistência a geneticina. Optou-se por usar geneticina como agente seletivo, pois em monocotiledôneas apresentam resistência natural a canamicina, fazendo com este antibiótico tenha pouca eficiência na seleção durante a regeneração das plantas (HAUPTMANN et al., 1988; BOWER et al., 1996).

Como observado na Tabela 3, dos oito experimentos realizados, seis tiveram o intuito exclusivo de regenerar plantas geneticamente modificadas. No entanto, no experimento 3, os calos não foram capazes de gerar plântulas, apresentando aparência esbranquiçada (não mostrado) mesmo após sucessivas transferências para meios MSRB novos e aumento da concentração do fitohormônio BAP de 0,5 mg.L⁻¹ para 1 mg.L⁻¹. Estes calos foram descartados 40 dias após o início da regeneração. A inviabilidade dos calos para regenerar plantas pode também ter sido responsável pelo resultado negativo no teste histoquímico realizado com parte dos calos deste mesmo experimento. Nos experimentos 6 e 8 (Tabela 4), todos os calos transformados morreram devido à seleção com antibiótico, demonstrando a não inserção do transgene no DNA genômico de cana.

Em todos os experimentos o número total de calos transformados foi de 180 calos. No experimento 2, foram regeneradas 10 plantas resistentes à geneticina (5,5 %), para no experimento 4, foram regeneradas 15 plantas resistentes à geneticina (8,3 %), enquanto que no experimento 5, foram regeneradas 50 plantas resistentes à geneticina (27,7 %). Todas as plantas regeneradas estão sendo mantidas em casa de vegetação. O tempo para obtenção de plantas transgênicas

putativas, considerando desde a cultura *in vitro* até a aclimação em casa de vegetação, levou em média 180 dias.

Para confirmação da transformação, o DNA genômico de todos os eventos foi extraído (*pool* gênico de duas a três plantas) e quantificado. A diagnose por PCR, para confirmação da presença do transgene, foi realizada inicialmente utilizando iniciadores específicos para a sequência promotora *SoMT1b*, que flanqueiam um fragmento de ~800 pb. O resultado da reação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose (Figura 19), onde se observa a amplificação dos fragmentos com o tamanho esperado em cinco amostras: 4, 5, 6, 7. Com esta confirmação, é possível afirmar que através da metodologia utilizada neste trabalho foi possível a obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar.

A utilização dos iniciadores específicos da sequência promotora *SoMT1b*, para avaliar as plantas putativas transgênicas, foi possível, pois iniciador *forward* é complementar ao adaptador PP2 presente na sequência promotora. As plantas também serão analisadas quanto à presença do gene *nptII*, que confere resistência a geneticina, porém estas reações ainda vem sendo otimizadas.

Figura 19 - PCR de DNA genômico de cana-de-açúcar transformadas com o promotor *SoMT1b*; (1-48) plantas transformadas com pGWFS7::SoMT1b; (C) Controle negativo de reação; (M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas). Fragmento de ~800 pb (seta). Gel 1% agarose

6 CONCLUSÕES

- As construções contendo os promotores sintéticos 4X W1-GUS, 4X GCC-GUS, 4X JERE-GUS e 4X W2/4xS-GUS foram capazes de dirigir uma baixa expressão do gene repórter GUS em calos embriogênicos de cana-de-açúcar;
- A construção contendo o promotor *SoMT1b* foi capaz de dirigir a expressão dos genes reportes GUS e GFP em epitélios de cebola, demonstrando a funcionalidade do promotor;
- A construção contendo o promotor *SoMT1b* foi capaz de dirigir a expressão do gene repórter GUS em calos embriogênicos de cana-de-açúcar;
- Transformação genética do Tomate 'Micro-Tom' com a construção do promotor de metalotioneína endógeno de cana-de-açúcar *SoMT1b* apresentou expressão do gene GUS nos frutos e sementes.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.E.M. Resultados do controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar com *Metarhizium anisopliae*. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – RIFIB, 9., 2003, Catanduva, SP. **Anais...** São Paulo: Instituto Biológico, 2003. p. 32-41.

ALTPETER, F.; BAISAKH, N.; BEACHY, R.; BOCK, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; DANIELL, H.; DATTA, K.; DATTA, S.; DIX, P.J.; FAUQUET, C.; HUANG, N.; KOHLIA, M.O.O.; IBROEK, H.; NICHOLSON, L.; NGUYEN, T.T.; NUGENT, G.; RAEMAKERS, K.; ROMANO, A.; SOMERS, D.A.; STOKER, E.; TAYLOR, N.; VISSER, R. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. **Molecular Breeding**, Heidelberg, v. 15, p. 305–327, 2005.

ANGELO, P. F. **Explorando a variação genética natural das espécies selvagens relacionadas ao tomateiro no modelo Micro-tom (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom)**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010. Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas . Piracicaba-SP, 2010.

ARAGÃO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; RECH, E.L. Feijão transgênico: um produto da engenharia genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 1, n. 5, p. 48-51, 1998. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio05/feijao.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2012.

ARENCIBIA, A.D.; CARMONA, E.R.; TÉLLEZ, P.; CHAN, M.T.; YU, S.; TRUJILLO, L.E.; ORAMAS, P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp.L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, Heidelberg, v. 7, p. 213-222, 1998.

AUGUSTYNIAK, J.; DABERT, M.; WYPIJEWSKI, K. Transgenes in plants: protection against viruses and insects. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 19, p. 561-569, 1994.

BARBOSA, A.L. **Regeneração de plantas a partir de calos embriogênicos e discos foliares visando transformação genética de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2010. 64 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

BATE, N.; TWELL, D. Functional architecture of a late pollen promoter: Pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 37, p. 859–869, 1998.

BIRCH, R.G.; BOWER, R.S.; ELLIOTT, A.R. Highly efficient, 5'-sequence-specific transgene silencing in a complex polyploid. **Tropical Plant Biology**, Heidelberg, v. 3, p. 88–97, 2010.

BOWER, R.; BIRCH, R.G.; Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant Journal**, Oxford, v. 2, p. 409–416, 1992.

BRAGA, D.P.V.; ARRIGONI, E.D.B.; BURNQUIST, W.L.; SILVA-FILHO, M.C.; ULIAN, E.C. A new approach for control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) through the expression of an insecti-cidal CryIa (b) protein in transgenic sugarcane. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 24., 2001, Brisbane, Australia. **Proceedings...** Quatre-Bornes, Mauritius, 2001. v. 2, p. 331–336.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

CAMARGO, S.R. **Identificação de gener e uso de promotores modulados pro etanol em cana-de-açúcar**. 2007. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, L.M.C.; ARRUDA, P.; FILHO, J.C.B.; BURNQUIST, W.L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J.; FIGUEIRA, A.; FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; GUZZO L.C.; HOFFMANN, H.P.; LANDELL, M.G.A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F.C.; ROMANO, E.; SILVA, W.; FILHO, M.C.S.; ULIAN, E.C. Sugarcane (*SaccharumXofficinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Heidleberg, v. 4, p. 62-89, 2011.

CHEN, C.; CHEN, Z. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 42, p. 387–396, 2000.

CHEN, W.H.; GARTLAND, K.M.A.; DAVEY, M.R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimaeric gene. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, p. 297-301, 1987.

CHEN, W.H.; GARTLAND, K.M.A.; DAVEY, M.R.; SOTAK, R.; GARTLAND, J.S.; MULLIGAN, B.J.; POWER, J.B.; COCKING, E.C. Transformation of sugarcane protoplasts by direct uptake of a selectable chimeric gene. **Plant Cell Reports**, New York, v. 6, p.297-301, 1987.

CHEN, S.; SONGKUMARN, P.; LIU, J.; WANG, G.-L. A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics. **Plant Physiology**, Rockville, v. 3, p. 111-121, 2009.

CHOI, D.; KIM, H.M.; YUN, H.K.; PARK, J.-A.; KIM, W.T.; BOK, S.H. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 353-359, 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira:** cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012. Brasília, DF: CONAB, 2012.

COMSTOCK, J.C.; PERDOMO, R.; POWELL, G.; WANG, Z. Ratoon stunting disease in Florida sugarcane fields: relationship between disease incidence and cultivar resistance. **Journal American of Sugarcane Technologists**, n.17, p.95-101, 1997.

COZZA, R.; PANGARO, T.; MAESTRINI, P.; GIORDANI, T.; NATALI, L.; CAVALLINI, A. Isolation of putative type 2 metallothionein encoding sequences and spatial expression pattern in the seagrass *Posidonia oceanica*. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 85, n. 4, p. 317-323, 2006.

DAFNY-YELIN, M.; TZFIRA, T. Delivery of multiple transgenes to plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 1118–1128, 2007.

D'HONT, A.; ISON, D.; ALIX, K.; ROUX, C.; GLASZMANN, J.C. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of the ribosomal genes. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 221-225, 1998.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DAVID-SCHWARTZ, R.; BADANI, H.; SMADAR, W.; LEVY, A.A.; GALILI, G.; KAPULNIK, Y. IDENTIFICATION OF A NOVEL GENETICALLY CONTROLLED STEP IN MYCORRHIZAL COLONIZATION: PLANT RESISTENCE TO INFECTION BY FUNGAL SPORES BUT NOT EXTRA-RADICAL HYPHAE. **THE PLANT JOURNAL**, OXFORD, V.27, P.561-569, 2001.

ELLERSTRÖM, M.; SFFDBERG, K.; EZCURRA, I.; RASK, L. Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 32, p. 1019-1027, 1996.

ELLIOTT, A.R.; CAMPBELL, J.A.; BRETTELL, R.I.S.; GROF, C.P.L. Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, p. 739-743, 1998.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; ROBATZEK, S.; SOMSSICH, I.E. The WRKY superfamily of plant transcription factors. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p. 199–206, 2000.

FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide resistance in a Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, p. 1188-1194, 2000.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, p. 761-766, 2003.

FIGUEIRA, A.; KIDO E.A.; ALMEIDA, R.S. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 207-220, 2001.

FRANKS, T.; BIRCH, R. G. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 18, n. 5, p. 471-480, 1991.

FRIZZAS, M.R.; CUNHA, U.S.; MACEDO, L.P.M.R. Plantas transgênicas resistentes. **Agrociência**, Chapingo, v. 10, n. 1, p. 13-18, 2004.

FULTON TM, CHUNWONGSE J, AND TANKSLEY SD. Microprep Protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, V.13, P. 207-209, 1995

FUTTERER, J.; KISS-LASZLO, Z.; HOHN, T. Nonlinear ribosome migration on cauliflower mosaic virus 35S RNA. **Cell**, Cambridge, v. 73, p. 789–802, 1993.

GEIJSKES, S.L. **Developmente of a high-level gene expression system for the production of bioplastics in sugarcane**. 2011. 196 p. Thesis (Doctor of Philosophy) - Center for Tropical Crops and Biocommodities, Queensland University of Technology, Brisbane, 2011.

GILBERT, R.A.; GLYNN, N.C.; COMSTOCK, J.C.; DAVIS, M.J. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane trans-formed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 111, p. 39–46, 2009.

GHANEM, S. Cloning of the nptII gene of *Escherichia coli* and construction of a recombinant strain harboring functional recA and nptII antibiotic resistance. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 3, p. 1445-1454, 2011.

GONÇALVES, M. C. Doenças causadas por vírus. In: DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico. p. 451- 464, 2008.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Regulation of gene transcription. In: _____. **Modern genetic analysis**. 3. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000. cap. 14.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, p. 122-127, 2001.

GRUDEN, K.; KUIPERS, A.G.; GUNCAR, G.; SLAPAR, N.; STRUKELJ, B.; JONGSMA, M.A. Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, p. 365-375, 2004.

GHOSH-BISWAS, G.C.; RANSOM, C.; STICKLEN, M. Expression of biological active *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in transgenic maize plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 171, p. 617-623, 2006.

HAJI, F.N.P.; ARAÚJO J.P.; NAKANO O.; SILVA JP.; TOSCANO J.C. Controle químico da traça-do-tomateiro *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) no submédio São Francisco. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.15, p 72-80, 1986.

HAMER, D.H. Metallothionein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 55, p. 913-951, 1986.

HAUPTMANN, R. M.; VASIL, V.; OZIAS-AKINS, P.; TABAEIZADEH, Z.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T.; HORSCH, R. B.; VASIL, I. K. EVALUATION OF SELECTABLE MARKERS FOR OBTAINING STABLE TRANSFORMANTS IN THE GRAMINEAE. *PLANT PHYSIOLOGY*, LANCASTER, V. 86, N. 2, P. 602-606, 1988.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, London, v. 27, p. 297–300, 1999.

HORSCH, R.B.; KLEE, H.J. Rapid assay of foreign gene-expression in leaf-disks transformed by *Agrobacterium tumefaciens* - role of T-DNA borders in the transfer process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 83, p. 4428-4432, 1986.

HOEKEMA, A.; HIRSCH, P.R.; HOOYKAAS, P.J.J. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, London, v. 303, p. 179–180, 1983.

JACKSON, A.M.; ANDERSON, D.J.; BIRCH, R.G. Comparison of *Agrobacterium* and particle bombardment using whole plasmid or minimal cassette for production of high-expressing, low-copy transgenic plants. **Transgenic Research**, London, Aug. 7, 2012. [Epub.]

JANNOO, N.; GRIVET, L.; DOOKUN, A.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Linkage disequilibrium among modern sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 1053-1060, 1999.

JONES, J.D.G.; GILBERT, D.E.; GRADY, K.L.; JORGENSEN, R.A. T-DNA structure and gene expression in *Petunia* plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 207, p. 478–485, 1987.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 92, p. 8041-8045, 1995.

KAJIHARA, D.; GODOY, F.; HAMAJI, T.A.; BLANCO, S.R.; SLUYS, M.A.; ROSSI, M. Functional characterization of sugarcane mustang domesticated transposases and comparative diversity in sugarcane, rice, maize and sorghum. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 3, p. 632-639, 2012.

KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. GATEWAY^{tm} vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Plant Science**, Amsterdam, v. 7, p. 93-95, 2002.

KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. Recombinational cloning with plant gateway vectors. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 1144–1154, 2007.

KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70–73, 1987.

KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D.A.; CHRISTOU, P. Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 95, p. 7203-7208, 1998.

KROPAT, J.; TOTTEY, S.; BIRKENBIHL, R.P.; DEPE`GE, N.; HUIJSER, P.; MERCHANT, S. A regulator of nutritional copper signaling in Chlamydomonas an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, p. 18730-18735, 2005.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cell & Development Biology - Plant**, Oxon, v. 41, p. 345-363, 2005.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; MOREAU, Y.; DE MOOR, B.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, London, v. 30, n. 1, p. 325-327, 2002.

LIMA, J. E.; CARVALHO, R. F.; TULMAN, A.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved in vitro shoot regeneration. **Plant Science**, Kidlington, V. 167, p. 753–757, 2004.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; PESSOA, L.G.A. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 791-798, 2005.

LEWIN, B. **Lewin: Genes VIII**. 8. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004.

LUO, H.; SONG, F.; GOODMAN, R.M.; ZHENG, Z. Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, p. 459-468, 2005.

LIMA, M.A.C.; GARCIA, R.O.; MARTINS, G.S.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* e susceptibilidade de calos de variedades nacionais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a agentes seletivos utilizados em sistemas de transformação genética. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2001.

MACHADO, L.A. **Estudo biológico e comportamentais de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) e sua interação com nematóides entomopatogênicos e outros agentes de mortalidade.** 2006. 141 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MAHESWARAN, G.; PRIDMORE, L.; FRANZ, P.; ANDERSON, M.A. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* transgenic apple plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 26, p. 773-782, 2007.

MELOTTO-PASSARIN, D.M. **Transformação genética de cana-de-açúcar por biolística e *Agrobacterium tumefaciens* visando estudar o mecanismo de morte celular programada.** 2009. 147 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MARSISCHKY, G.; LABAER, J. Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 14, p. 2020–2028, 2004.

MATZKE, M.A.; MOSCONE, E.A.; PARK, Y.D.; PAPP, I.; OBERKOFER, H.; NEUHUBER, F.; MATZKE, A.J. Inheritance and expression of a transgene insert in an aneuploid tobacco line. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 245, p. 471-485, 1994.

MATZKE, M.A.; MATZKE, A.J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: what does it really tell us? **Trends in Genetics**, New York, v. 11, p.1-3, 1995.

MCELROY, D.; ZHANG, W.; CAO, J.; WU, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. **Plant Cell**, Rockville, v. 2, p. 163-171, 1990.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALE, V.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics. **Plant Journal**, Oxford, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MEINKE, D.W.; CHERRY, J.M.; DEAN, C.; ROUNSLEY, S.D.; KOORNNEEF, M. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. **Science**, Washington, DC, v. 282, p. 662-665, 1998.

MENKE, F.L.H.; CHAMPION, A.; KIJNE, J.W.; MEMELINK, J. A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. **EMBO Journal**, Oxford, v. 18, p. 4455–4463, 1999.

MUDGE, S.; OSBE, K.; CASU, R.; BONNETT, G.; MANNERS, J.; BIRCH, R. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 3, p. 549-558, 2009.

MÜLLER, A.E.; WASSENEGGER, M. Control and silencing of transgene expression. In: **Handbook of plant biotechnology**. New York: Wiley, 2004. pt. 3. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com>. Acesso em: 02 ago. 2012.

NUTT, K.A.; ALLSOPP, P.G.; MCGHIE, T.K.; SHEPHERD, K.M.; JOYCE, P.A.; TAYLOR, G.O.; MCQUALTER, R.B.; SMITH, G.R.; HOGARTH, D.M. Transgenic sugarcane with increased resistance to canegrubs. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Townsville, v. 21, p. 171-176, 1999.

O'CALLAGHAN, M.; BROWNBRIDGE, M.; STILWELL, W.B.; GERARD, E.M.; BURGESS, E.P.; BARRACLOUGH, E.I.; CHRISTELLER, J.T. Effects of tobacco genetically modified to express protease inhibitor bovine spleen trypsin inhibitor on non-target soil organisms. **Environmental Biosafety Research**, Les, Ulis, v. 6, p. 183-195, 2007.

OHME-TAGAKI, M.; SUZUKI, K.; SHINSHI, H. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 41, p. 1187-1192, 2000.

PAPINI-TERZI, F.; ROCHA, F.R.; VÊNCIO, R.Z.; FELIX, J.M.; BRANCO, D.S.; WACLAWOVSKY, A.J.; DEL BEM, L.; LEMBKE, C.G.; COSTA, M.; NISHIYAMA JR, M.; VICENTINI, R.; VINCENTZ, M.; ULIAN, E.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 120, p. 1-21, 2009.

PARK, Y.D.; PAPP, I.; MOSCONE, E.A.; IGLESIAS, V.A.; VAUCHERET, H.; MATZKE, A.J.; MATZKE, M.A. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. **Plant Journal**, Oxford, v. 9, p. 183-194, 1996.

PAULILLO, L.C.M.; SEBBENN, A. M.; DERBYSHIRE, M. T. V.; NETO, A.G.; BROTTTO, M. A. P; FIGUEIRA, A. Valuation of in vitro and in vivo effects of semipurified proteinase inhibitors from theobromaseeds on midgut protease activity of lepidopteran pest insects. **Insect Biochemistry and Physiology**, V.81, N.1, P34-54, 2012.

PERES, L.E.P.; MORGANTE, P. G.; VAN-SLUYS, M.A.; KRAUS, J.E.; VECHI, C. SHOOT REGENERATION CAPACITY FROM ROOTS AND TRANSGENIC HAIRY ROOTS OF DIFFERENT TOMATO CULTIVARS AND WILD RELATED SPECIES. **PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE**, DORDRECHT, V.65, P.37-44, 2001.

PETRASOVITS, L. A.; ZHAO, L.; MCQUALTER, R. B.; SNELL, K. D.; SOMLEVA M.N.; PATTERSON, N. A.; NIELSEN, L.K.; BRUMBLEY, S. M. Enhanced

polyhydroxybutyrate production in transgenic sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.10, p. 569–578, 2012.

PICELLI, E.C.M. **Cultura de tecido e transformação genética com o gene *Ddm1* no estudo do silenciamento de elementos de transposição em cana-de-açúcar**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

POMPERMAYER, P. **Identificação e caracterização de um promotor de cana-de-açúcar induzido por herbivoria**. 2004. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

RAUSER, W.E. Structure and function of metal chelators produced by plants. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 31, p. 19-48, 1999.

ROSAS-GARCÍA, N.M. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, p. 855-861, 2006.

QUINN, J.M.; BARRACO, P.; ERIKSSON, M.; MERCHANT, S. Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *chlamydomonas* is mediated by the same element. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 9, p. 6080–6089, 2000.

QUINN, J.M.; ERIKSSON, M.; MOSELEY, J.L.; MERCHANT, S. Oxygen deficiency responsive gene expression in *chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. **Plant Physiology**, Rockville, v. 128, p. 463–471, 2002.

RECH, E.L.; VAINSTEIN, M.H.; DAVEY, M.R. An electrical particle acceleration gun for gene transfer into cells. **Technique**, New York, v. 3, p. 143-149, 1991.

ROBINSON, N.J.; TOMMEY, A.T.; KUSKE, C.; JACKSON, P.J. Plant metallothioneins. **Biochemical Journal**, London, v. 295, p. 1-10, 1993.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA JUNIOR, M.Y.; VÊNCIO, R.Z.N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.C.; ROSA JUNIOR, V.E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H.; RODRIGUES, F.A.; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M.; GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.O.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 71, p. 1-22, 2007.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; LETERRIER, M.; RODRIGUES-SERRANO, M.; del RIO, L.A.; PALMA, J.M. Glutathione reductase from pealeaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme., **Phytologist**, v.170, p.43-52, 2006.

RYAN, C.A. Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

RUSHTON, P.J.; TORRES, J.T.; PARNISKE, M.; WERNERT, P.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. **EMBO Journal**, Oxford, v. 15, p. 5690–5700, 1996.

RUSHTON, P.J.; REINSTÄDLER, A.; LIPKA, V.; LIPPOK, B.; SOMSSICH, I.E. synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 749-762, 2002.

SALINAS, J.; OEDA, K.; CHUA, N.H. Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 1485–1493, 1992.

SANTOS, A. S. Doenças causadas por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 423-435, 2008.

SCOTT, A.; WYATT, S.; TSOU, P.L.; ROBERTSON, D.; ALLEN, N.S. Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. **BioTechniques**, Natick, v. 26, p. 1125, 1999.

SCHENK, P.M.; SAGI, L.; REMANS, T.; DIETZGEN, R.G.; BERNAR, M.J.; GRAHAM, M.W.; MANNERS, J.M. A promoter from sugarcane bacilliform badnavirus drives transgene expression in banana and other monocot and dicot plants. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 39, p. 1221–1230, 1999.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE, S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 97, p. 11655-11660, 2000.

SCHENK, P.M., REMANS, T., SAGI, L., ELLIOTT, A.R., DIETZGEN, R.G., SWENNEN, R., EBERT, P.R., GROF, C.P.L. AND MANNERS, J.M. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v.47, p. 399–412, 2001.

SERENO, M.L. **Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) sob condições de estresse**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SILVA, W. **Estudo da ação do inibidor de proteinase de Adenanthera pavonina sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas de Diatraea Saccharalis (FABR, 1794)**. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

SHIRSAT, A.; WILFORD, N.; CROY, R.; BOULTER, D. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 215, p. 326–333, 1989.

SHRAWAT, A.K.; LORZ, H. Agrobacterium-mediated trans-formation of cereals: a promising approach crossing bar-riers. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 4, p. 575–603, 2006.

SOUZA, G.M.; SIMOES, A.C.R.; OLIVEIRA, K.C.; GARAY, H.M.; FIORINI, L.C.; GOMES, F.D.; NISHIYAMA-JUNIOR, M.Y.; DA SILVA, A.M. The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 25-34, 2001.

STACHEL, S.E.; MESSENS, E.; VANMONTAGU, M.; ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant-cells that activate T-DNA transfer in agrobacterium-tumefaciens. **Nature**, London, v. 318, p. 624-629, 1985.

STALBERG, K.; ELLERSTOM, M.; EZCURRA, I.; ABLOV, S.; RASK, L. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the napA storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds. **Planta**, Berlin, v. 199, p. 515–519, 1996.

STEPHEN, T.S.; JAMES T. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.72, p.449-479, 2003.

TIAN, J.; SHEN, H.; ZHANG, J.; SONG, T.; YAO, Y. Characteristics of chalcone isomerase promoter in crabapple leaves (M.cv. 'royalty') and transient expression assay modified in onion epidermal cell. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 50, p. 10232-10240, 2011.

TRANKSLEY, S.D. Linkage map of tomato (*Lycopersicon Esculentum*) (2N=24). In: O'BRIEN, J. (Ed.). **Genetic maps: locus maps of complex genomes**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. p. 639-660.

TZAFRIR, I.; TORBERT, K.A.; LOCKHART, B.E.; SOMERS, D.A.; OLSZEWSKI, N.E. The sugarcane bacilliform badnavirus promoter is active in both monocots and dicots. **Plant Molecular Biology**, Heidelberg, v. 38, p. 347-356, 1998.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO - UNICA. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 10 jun. 2012.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, London, v. 327, p. 33-37, 1987.

VERT, G.; GROTZ, N.; DEDALDECHAMP, F.; GAYMARD, F.; GUERINOT, M.L.; BRIAT, J.F.; CURIE, C. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 1223–1233, 2002.

VENTER, M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. **Plant Science**, Amsterdam, v. 12, p. 118-124, 2007.

VETTORE, A.L.; SILVA, F.R.; KEMPLER, E.L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VICKERS, J.E.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; JACKSON, P.A.; MORGAN, T.E. Effects of tissue culture, biolistic transformation, and introduction of PPO and SPS gene constructs on performance of sugarcane clones in the field. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, p. 57–68, 2005.

VITALE, A.; CERIOTTI, A. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, p.3420-3426, 2004.

WACLAWOVSKY, A.J.; SATO, P.M.; LEMBKE, C.G.; MO-ORE, P.H.; SOUZA, G.M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, p. 1-14, 2010.

WANG, W. X.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 560, p. 285-292, 2001.

WENCK, A.; PUGIEUX, C.; TURNER, M.; DUNN, M.; STACY, C.; TIOZZO, A.; DUNDER, E.; VAN GRINSVEN, E.; KHAN, R.; SIGAREVA, M.; WANG, W.C.; REED, J.; DRAYTON, P.; OLIVER, D.; TRAFFORD, H.; LEGRIS, G.; RUSHTON, H.; TAYAB, S.; LAUNIS, K.; CHANG, Y.F.; CHEN, D.F.; MELCHERS, L. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 244–251, 2003.

WEI, H.; WANG, M.L.; MOORE, P.H.; ALBERT, H.H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, p. 1241-1251, 2003.

WENG, L.X.; DENG, H.; XU, J.L.; LI, Q.; WANG, L.H.; JIANG, Z.; ZHANG, H.B.; LI, Q.; ZHANG, L.H. Regeneration of sugarcane elite breeding lines and engineering of stem borer resistance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 62, p. 178-187, 2006.

WHITE, W.H.; MILLER, J.D.; MILLIGAN, S.B.; BURNER, D.M.; LEGENDRE, B.L. Inheritance of sugarcane borer resistance in sugarcane derived from two measures of insect damage. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1706-1710, 2001.

WILMINK, A.; VAN DEN VEN, B.C.E.; DONS, J.J.M. Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 28, p. 949–955, 1995.

XIONG, L.M.; ISHITANI, M.; ZHU, J.K. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 205-211, 1999.

YADAV, T.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S.L. Efficient *in vitro* plant regeneration and generation of transgenic plants in barley (*Hordeum vulgare*L.) using particle bombardment. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, 2012. DOI 10.1007/s13562-012-0149-7.

YANG, M.; BROWER, R.; BUROW, M.D.; PETERSON, A.H.; MIRKOV, T.E. Genomics, molecular genetics & biotechnology: a rapid and direct approach to identify promoters that confer high levels of gene expression in monocots. **Crop Science**, Madison, v. 43, p. 1805-1813, 2003.

YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 90, p. 353–362, 2000.

Zhao, H. W.; Ali, S. S.; Haddad, G. G. Does Hyperoxia Selection Cause Adaptive Alterations of Mitochondrial Electron Transport Chain Activity Leading to a Reduction of Superoxide Production?. *Antioxidants & Redox Signaling*. V16, 1071 -76p, 2012.

ZHOU, G.-K.; XU, Y.-F.; LI, J.; YANG, L.; LIU, J.-Y. Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa*L.). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Berlin, v.39, p.595-606, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A - Alinhamento da sequência consenso obtida para o promotor de metalotioneína *SoMT1b*, clonada no vetor de entrada pCR8, com a sequência isolada por Sereno (2009)

SoMT1b	:	AGGGC	ACGCGTGGT	CCCTCCG	GCTATGTGA	ACTTGT	GGATCTGATGC	CAGGAAGTGTTCACACGCTAG	-G	:	70		
SoMT1b_esp	:	AGGGC	CGCGTGGT	GGCCCTAG	CTA	GTGA	ACTTGT	GGATC	GATGC	CAGGAAGTGTTCACACGCTAG	TG	:	67
		AGGGC	CGCGTGGT	C C	GCTA	GTGA	ACTTGT	GGATC	GATGC	AGGAAGTGTTCACACGCTAG	G		
		80	*	100	*	120	*	140					
SoMT1b	:	TATATATGCTTCAATAA	TTGACACTGGTGCAGAAATGATACACGCATCATAAAAGAGACT	GTAAATCTAAT	:	141							
SoMT1b_esp	:	TATATATGCTTCAATAA	TTGACACTGGTGCAGAAATGATACACGCATCATAAAAGAGACT	TAAATCTAAT	:	137							
		TATATATGCTTCAATAA	TTGACACTGGTGCAGAAATGATACACGCATCATAAAAGAGACT	TAAATCTAAT									
		*	160	*	180	*	200	*					
SoMT1b	:	T	TGCAC	TGATTATTATTAGTTGTGTTCC	TTTCATCTGAGCTCTTAACGTGTTATATTTTAATTTTCGCACA	:	211						
SoMT1b_esp	:	T	TGCAC	TGATTATTATTAGTTGTGTTCC	TTTCATCTGAGCTCTTAACGTGTTATATTTTAATTTTCGCACA	:	208						
		T	TGCAC	TGATTATTATTAGTTGTGTTCC	TTTCATCTGAGCTCTTAACGTGTTATATTTTAATTTTCGCACA								
		220	*	240	*	260	*	280					
SoMT1b	:	TCAACAACCCCTG	-CAGGTCCACAAGCATTTT	TGGTCTGGTAGCATCTACTACCCTG	ATTTCTGAAATCT	:	281						
SoMT1b_esp	:	TCAACAACCCCTG	-CAGGTCCACAAGCATTTT	TGGTCTGGTAGCATCTACTACCCTG	TTTCTGAAATCT	:	279						
		TCAACAACCCCTG	CAGGTCCACAAGCATTTT	TGGTCTGGTAGCATCTACTACCCTG	TTTCTGAAATCT								
		*	300	*	320	*	340	*					
SoMT1b	:	AAGATTTTTTTAGTTATTTATGTAAGACAACTATTTAAGTTTGACC	-AATTTTATAGAAAAGAAGAAAAA	:	351								
SoMT1b_esp	:	AAGATTTTTTTAGTTATTTATGTAAGACAACTATTTAAGTTTGACC	-AATTTTATAGAAAAGAAGAAAAA	:	350								
		AAGATTTTTTTAGTTATTTATGTAAGACAACTATTTAAGTTTGACC	AATTTTATAGAAAAGAAGAAAAA										
		360	*	380	*	400	*	420					
SoMT1b	:	TATTACATCGTT	-TGGTACATCTTGTTG	--CGCTAGAAG	-ACGTTAATATTCTT	-CTCTATATAA	--GCTT	:	415				
SoMT1b_esp	:	TATTACATCGTT	-TGGTACATCTTGCTG	TGCGCTACAAG	SACGTTAATATTCTT	CTCTATATTAAG	GCTT	:	421				
		TATTACATCGTT	TGGTACATCTTG TG	CGCTA AAG	ACGTTAATATTCTT	CTCTATAT A	GCTT						
		*	440	*	460	*	480	*					
SoMT1b	:	GATCAAAC	TTAAGAT	GATTTGACTTT	GTAATCGACGAGAACATA	-GGGGGAGG	-ACCACAACAACAAA	:	481				
SoMT1b_esp	:	GATCAAAC	TTAAGAT	GATTTGACTTT	GTAATCGACGAGAACATA	TGGGGGAGG	ACCACAACAACAAA	:	492				
		GATCAAAC	TT AAGAT	GATTTGACTTT	GTAATCGACGAGAACATA	GGGGGAGG	ACCACAACAACAAA						
		500	*	520	*	540	*	560					
SoMT1b	:	AAAGAAGAAGAAAAATGGAATCGAATTACCAAGTCGAAATCGAAATATATACTCCAATCTAGAACAA	TGCT	:	552								
SoMT1b_esp	:	AAAGAAGAAGAAAAATGGAATCGAATTACCAAGTCGAAATCGAAATATATACTCCAATCTAGAACAA	TTCT	:	563								
		AAAGAAGAAGAAAAATGGAATCGAATTACCAAGTCGAAATCGAAATATATACTCCAATCTAGAACAA	CT										
		*	580	*	600	*	620	*	64				
SoMT1b	:	GGAGACAAGTGGTGGGCATTGGAT	-CGGAGG	-CCAAGGAGGACTTGG	TTCTGGAGGGAGCCTATGGCGTGG	:	621						
SoMT1b_esp	:	GGAGACAAGTGGTGGGCATTGGAT	TCGGAGG	CCAAGGAGGACTTG	TTCTGGAGGGAGCCTATGGCGTGG	:	633						
		GGAGACAAGTGGTGGGCATTGGAT	CGGAGG	CCAAGGAGGACTTG	TTCTGGAGGGAGCCTATGGCGTGG								
		0	*	660	*	680	*	700	*				
SoMT1b	:	TGACAC	GCACGTTGCGTGCCTGTGTTGGCTCA	TTTGGCCGAATCCTCCATCCACTGCTATAA	CAACCGGT	:	692						
SoMT1b_esp	:	TGACAC	GCACGTTGCGTGCCTGTGTTGGCTCA	TTTGGCCGAATCCTCCATCCACTGCTATAA	AACCGGT	:	704						
		TGACAC	GCACGTTGCGTGCCTGTGTTGGCTCA	TTGGCCGAATCCTCCATCCACTGCTATAA	AACCGGT								
		720	*	740	*	760	*	780					
SoMT1b	:	GTTGGGGTTCA	-TTTGTT	-CTCAAG	ACTCAA	-C	-CAAGCAAAGACGA	-CTATGTAAGACGCCCTTTGGTAG	:	758			
SoMT1b_esp	:	GTTGGGGTTCA	CTTTGTT	CTCAAG	CTCAA	ACA	CAAGCAAAGACGA	GCTTTGTAAGACGCCCTTTGGTAG	:	774			
		GTTGGGGTTCA	TTTGTT	CTCAAG	CTCAA	C	CAAGCAAAGACGA	CT TGTAAGACGCCCTTTGGTAG					

Apêndice B - Alinhamento da sequência consenso obtida para o promotor *WRKY/SoMT1a*, clonado no vetor de entrada pCR8, com a sequência esperada montada *in silico*, com base na sequência isolada por Sereno (2009)

```

      *      20      *      40      *      60      *
WRKY   : AAGCTTTTGACCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGATGCGAGGAAGTTCT : 73
WRKY_esp : AAGCTTTTGACCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGATGCGAGGAAGTTCT : 73
          AAGCTTTTGACCACTATAGGGCACGCGTGGTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGATCGATGCGAGGAAGTTCT

      80      *      100     *      120     *      140
WRKY   : CACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAATGGTACATCATAAAAGAAGCTGAAGAT : 146
WRKY_esp : CACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAATGGTACATCATAAAAGAAGCTGAAGAT : 146
          CACACGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAACAGCAATGGTACATCATAAAAGAAGCTGAAGAT

      *      160     *      180     *      200     *      22
WRKY   : TTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCTTAACGTTGTCATTTAAATTTTCGCACATCAACC : 219
WRKY_esp : TTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCTTAACGTTGTCATTTAAATTTTCGCACATCAACC : 219
          TTCCACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCTTAACGTTGTCATTTAAATTTTCGCACATCAACC

      0      *      240     *      260     *      280     *
WRKY   : CCTGCAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTT : 292
WRKY_esp : CCTGCAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTT : 292
          CCTGCAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTT

      300     *      320     *      340     *      360
WRKY   : TCAGTTATTAATTCATCCTGTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCTCT : 364
WRKY_esp : TCAGTTATTAATTCATCCTGTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCTCT : 365
          TCAGTTATTAATTCATCCTGTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCTCT

      *      380     *      400     *      420     *      4
WRKY   : CTCACAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAAAT : 437
WRKY_esp : CTCACAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAAAT : 437
          CTCACAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAAAT

      40      *      460     *      480     *      500     *
WRKY   : ATTACATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACTTA : 510
WRKY_esp : ATTACATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACTTA : 510
          ATTACATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACTTA

      520     *      540     *      560     *      580
WRKY   : GATGATTTAACTTAGCGGTCGACAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAAAATGAATTGAAT : 583
WRKY_esp : GATGATTTAACTTAGCGGTCGACAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAAAATGAATTGAAT : 583
          GATGATTTAACTTAGCGGTCGACAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAAAATGAATTGAAT

      *      600     *      620     *      640     *
WRKY   : TACCATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGGTAGAATAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGAT : 656
WRKY_esp : TACCATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGGTAGAATAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGAT : 655
          TACCATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGGTAGAATAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGAT

      660     *      680     *      700     *      720     *
WRKY   : CGGATTGGAGGCCAGGAGGACTTGTTCTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTG : 729
WRKY_esp : CGGATTGGAGGCCAGGAGGACTTGTTCTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTG : 728
          CGGATTGGAGGCCAGGAGGACTTGTTCTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTG

      740     *      760     *      780     *      800
WRKY   : TTGGCTTAaTAaTGgGcGgAtCCTCCATCCGCTGCTATAAAA-CCGGTGCTGGGGGCATTtGTGCTCAAGC : 801
WRKY_esp : TTGGCTTAATAATTGGCCGAATCCTCCATCCGCTGCTATAAAA-CCGGTGCTGGGGGCATTtGTGCTCAAGC : 801
          TTGGCTTAATAAT GGCCG ATCCTCCATCCGCTGCTATAAAA CCGGTGCTGGGGC CATTtGTGCTCAAGC

      *      820     *      840     *
WRKY   : TCAaC-AAAaGCGAAAaCgACTTGTaAGaGcGcC-ctTtGGTAAT-- : 844
WRKY_esp : TCAACGAAAGCGAAAACGACTTGTaAGaGcGcCCTTtGGTAGAT-- : 846
          TCAAC AAAGCGAAAACGACTT GTaAGaGcGcC CTTtGGTA AT

```

Apêndice C - Alinhamento da sequência consenso obtida para o promotor *JERE/SoMT1a*, clonado no vetor de entrada pCR8, com a sequência esperada montada *in silico* com base na sequência isolada por Sereno (2009)

```

      *      20      *      40      *      60      *
JERE   : TCGCGTAGTAGACCGGCAGCTGAGTTTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGCTCGATGcGaGcAGGTTCTCCCA : 73
JERE_esp : ACGCGTGTAGACCGCCA----AGGTTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAGCTCGATGCGAGGAAGTTCTCACA : 69
          CGCGT GTAGA CG CA AG TTGGCCCTAGCTAGTGAACCTGTAG TCGATGCGAG A GTTCTC CA

      80      *      100      *      120      *      140
JERE   : CGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGACAGCaATGGTACATCATAgAAGAAGATGAAGATTTC : 146
JERE_esp : CGCTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGAAACAGCAATGGTACATCATAAAGAAGCTGAAGATTTC : 142
          CGTAGGTATATATGCTTCAGTAATTGACACTGGA CAGCAATGGTACATCAT AAGAAG TGAAGATTTC

      *      160      *      180      *      200      *      22
JERE   : ACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCTTAACGTGTTGCATTTAAATTTTCGCACATCAACCCCTG : 219
JERE_esp : ACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCTTAACGTGTTGCATTTAAATTTTCGCACATCAACCCCTG : 215
          ACTGATTATTAGTTGTGTTTCGTTTCAGCTCAGCTCT AACGTGTTGCATTTAAATTTTCGCACATCAACCCCTG

      0      *      240      *      260      *      280      *
JERE   : CAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTTTCAG : 292
JERE_esp : CAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTTTCAG : 288
          CAGGTCCACAATCAATTTTCGCACATCAGCCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTTTCAG

      300      *      320      *      340      *      360
JERE   : TTATTAATTCATCCTGTTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCCTCTCA : 365
JERE_esp : TTATTAATTCATCCTGTTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCCTCTCA : 361
          TTATTAATTCATCCTGTT CTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTTTTCCTCTCA

      *      380      *      400      *      420      *      4
JERE   : CAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAAATATTG : 438
JERE_esp : CAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAAATATTG : 433
          CAACAAATCAGTACAAGCATAAGGCAAACATTTTCATGTTTGAGCAAATCTATAGAAAAGAAGAAAA TATTG

      40      *      460      *      480      *      500      *
JERE   : CATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACCTAGATG : 511
JERE_esp : CATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACCTAGATG : 506
          CATCATTTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTATAAGGTTGATCAAACCTAGATG

      520      *      540      *      560      *      580
JERE   : ATTTAACTTAGCGGT--ACAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAATGAATTGAATTACC : 582
JERE_esp : ATTTAACTTAGCGGTGACAAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAATGAATTGAATTACC : 579
          ATTTAACTTAGCGGT ACAATGATAAAGGGACTACCACAATAAATAAAAAATAAAATGAATTGAATTACC

      *      600      *      620      *      640      *
JERE   : ATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGTAGAATAAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGATCGGAT : 655
JERE_esp : ATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGTAGAATAAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGATCGGAT : 652
          ATGTCGAAATCGAAATAAATATATACTCCAAGGTAGAATAAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGATCGGAT

      660      *      680      *      700      *      720      *
JERE   : TGGAGGCCAGGAGGACTTGTACTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTGTTGG : 728
JERE_esp : TGGAGGCCAGGAGGACTTGT--CTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTGTTGG : 724
          TGGAGGCCAGGAGGACTTGT CTGGAGGGAGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTGTTGG

      740      *      760      *      780      *      800
JERE   : CTTAATAATTGGCCGAATCCTCCATCCGCTGCTATAAAAACCGGTGCTGGGGCTCATTTGTGTTCAAGCTCAA : 801
JERE_esp : CTTAATAATTGGCCGAATCCTCCATCCGCTGCTATAAAAACCGGTGCTGGGGCTCATTTGTGTTCAAGCTCAA : 797
          CTTAATAATTGGCCGAATCCTCCATCCGCTGCTATAAAAACCGGTGCTGGGGCTCATTTGTG TCAAGCTCAA

      *      820      *      840      *
JERE   : ACCAAAGC-AgACCTtGTTAACAAGGGAaagtCCACTA-GGT---- : 842
JERE_esp : -CCAAAGCGAAACGACTTTGTAAAGACG-----CCACTTTGGTAGAT : 838
          CCAAAGC A A C TT AA A G CCACT GGT

```