

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização Funcional de Três Fatores de Transcrição Dof de
*Eucalyptus grandis***

Dissertação de Mestrado

Raíssa Volpatto Marques

Março de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Caracterização Funcional de Três Fatores de Transcrição Dof de
*Eucalyptus grandis***

Raíssa Volpatto Marques

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

Março de 2018

Instituição e Fontes Financiadoras

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

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Irene pelo amor, incentivo e apoio incondicionais.

Ao meu irmão Marcelo que, como químico, deu-me grande força e incentivo a seguir na área da ciência.

Ao meu orientador, Dr. Giancarlo Pasquali, por todos os ensinamentos e orientações que foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho e de minha formação acadêmica.

Agradeço à Dra. Fernanda C. Lopes pelas orientações dadas ao longo deste trabalho.

Agradeço à aluna de Iniciação Científica Rafaela A.H. Gaiga que esteve participando deste trabalho desde o início.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal pela colaboração, apoio e pelos vários momentos de descontração.

Aos amigos que estiveram ao meu lado durante toda esta jornada, vocês foram essenciais na conclusão desta etapa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar um ambiente acadêmico de qualidade.

Aos secretários, professores e colegas do PPGBCM e CBiot.

À CAPES e ao CNPq pelos apoios financeiros concedidos.

Sumário

Lista de Tabelas	7
Lista de Figuras	8
Lista de Abreviaturas, símbolos e unidades.....	10
Resumo	13
Abstract	14
1. Introdução.....	15
1.1 A família <i>Dof</i> de fatores de transcrição.....	15
1.2 A estrutura dos fatores de transcrição <i>Dof</i>	15
1.3 Estudos funcionais das proteínas <i>Dof</i>	17
1.4 O Gênero <i>Eucalyptus</i>	18
1.5 <i>Eucalyptus</i> como alvo de melhoramento genético.....	19
2. Justificativa	22
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. Materiais e Métodos.....	23
4.1 Identificação de gene(s) <i>Dof</i> de <i>E. grandis</i> potencialmente críticos à gênese da madeira	23
4.2 Projeção e síntese de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) para as sequências codificadoras dos genes <i>Dof</i>	23
4.3 Extração de ácidos nucleicos de <i>E. grandis</i>	24
4.4 Síntese de cDNA	24
4.5 Clonagem das sequências codificadoras dos genes <i>Dof</i> no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e confirmação de clones positivos.....	27
4.6 Sequenciamento dos genes de interesse clonados em pENTR/D-TOPO e purificação das minipreparações plasmidiais	29
4.7 Ensaio de expressão dos genes <i>Dof</i> em <i>A. thaliana</i>	30
4.7.1 Recombinação das sequências codificadoras <i>Dof</i> no vetor de destino pH7WG2D e seleção de clones positivos	30
4.7.2 Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 e seleção de clones positivos	31
4.7.3 Cultivo de <i>A. thaliana</i>	32
4.7.4 Transformação genética de <i>A. thaliana</i> com vetor binário capaz de promover a expressão dos genes <i>Dof</i>	33
4.7.5 Seleção de plantas transgênicas de <i>A. thaliana</i>	33
4.8 Ensaio de localização subcelular dos genes <i>Dof</i>	34
4.8.1 Análise <i>in silico</i> da localização subcelular dos genes <i>Dof</i>	34
4.8.2 Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i> e seleção de clones positivos das transformações com o vetor binário pH7WGF2- <i>Dof</i>	34
4.8.3 Agroinfiltração.....	35
4.8.4 Ensaio de fluorescência	36
4.9 Expressão heteróloga de genes <i>Dof</i> em <i>E. coli</i>	36

4.9.1	Projeção de <i>primers Dof</i> -específicos para as etapas de clonagem molecular no vetor pGEX-4T-1	36
4.9.2	Amplificação dos três genes <i>Dof</i> a partir de pENTR/D-TOP para as etapas de clonagem no vetor de expressão pGEX-4T-1	39
4.9.3	Digestão dos <i>amplicons Dof</i> e do vetor de expressão pGEX-4T-1	40
4.9.4	Ligação dos insertos em pGEX-4T-1 e seleção de clones positivos	40
4.9.5	Transformação de linhagens de expressão bacteriana e seleção de clones positivos ...	42
4.9.6	Ensaio de indução da expressão gênica e análise da expressão por SDS-PAGE	43
4.9.7	Ensaio de <i>dot blot</i> e <i>western blot</i>	44
4.9.8	Expressão em maior escala e purificação das proteínas recombinantes	45
5.	Resultados e Discussão	47
5.1	Seleção dos genes <i>Dof</i> de <i>E. grandis</i> potencialmente críticos à genese da madeira	47
5.2	Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA correspondente aos transcritos <i>Dof</i>	48
5.3	Clonagem dos amplicons <i>Dof</i> em pENTR/D-TOPO e confirmação de clones positivos	52
5.4	Ensaio de expressão dos genes <i>Dof</i> de <i>E. grandis</i> em <i>A. thaliana</i>	55
5.4.1	Recombinação dos genes <i>Dof</i> clonados em pENTR/D-TOPO ao vetor binário pH7WG2D	55
5.4.2	Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i> com pH7WG2D- <i>Dof</i>	57
5.4.3	Transformação genética de <i>A. thaliana</i> com <i>A. tumefaciens</i> EHA105::pH7WG2D- <i>Dof</i> e seleção de plantas transgênicas	58
5.5	Ensaio de localização subcelular	60
5.5.1	Recombinação dos genes <i>Dof</i> clonados em pENTR/D-TOPO com o vetor binário pH7WGF2 e transformação genética de <i>A. tumefaciens</i> EHA105	60
5.5.2	Análises da localização subcelular das proteínas <i>Dof</i>	61
5.6	Expressão heteróloga de genes <i>Dof</i> em <i>E. coli</i>	64
5.6.1	Isolamento dos genes <i>Dof</i> a partir de pENTR/D-TOPO	64
5.6.2	Clonagem dos genes <i>Dof</i> no vetor de expressão pGEX-4T-1	65
5.6.3	Expressão dos genes <i>Dof</i> em linhagens de expressão de <i>E. coli</i>	67
5.6.4	Produção das proteínas <i>Dof</i> em maior escala e purificação a partir de culturas de <i>E. coli</i>	72
6.	Conclusões e Perspectivas	76
7.	Material Suplementar	78
7.1	Sequências dos Genes <i>Dof</i>	78
7.2	Mapa do Plasmídeo pXH2FS7	82
8.	Referências bibliográficas	83
9.	Curriculum Vitae	91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequências e temperaturas médias de desnaturação (T_m) dos <i>primers</i> projetados para as regiões codificantes dos genes <i>Dof</i>	24
Tabela 2. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes <i>Dof</i>	26
Tabela 3. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes <i>Dof</i> a partir de <i>Pfu DNA Polymerase</i>	27
Tabela 4. Sequência e temperatura média de desnaturação (T_m) dos <i>primers</i> projetados para a clonagem molecular de genes <i>Dof</i> no vetor pGEX-4T-1..	38
Tabela 5. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes <i>Dof</i> para as etapas de clonagem em pGEX-4T-1	39
Tabela 6. Linhagens de <i>E. coli</i> escolhidas para os ensaios de expressão dos genes <i>Dof</i> de <i>E. grandis</i>	42

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do domínio Dof de <i>Eleusine coracana</i> e sua sequência de aminoácidos.....	16
Figura 2. Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen).....	28
Figura 3. Mapa do vetor binário pH7WG2D,1 (VIB).....	30
Figura 4. Mapa do vetor binário pH7WGF2,1(VIB).....	34
Figura 5. Imagem representativa do método de agroinfiltração de folhas de <i>N. benthamiana</i> com <i>A. tumefaciens</i> EHA105 armadas com os genes de interesse <i>Dof</i>	36
Figura 6. Mapa do vetor de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare).....	37
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% de ácidos nucleicos extraídos de tecido vascular de <i>E. grandis</i>	49
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos da RT-PCR utilizando-se <i>primer</i> oligo(dT) para a síntese de cDNA.....	50
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos dos genes <i>Dof</i> amplificados pela enzima <i>Pfu DNA Polymerase</i> a partir de amostra de RNA total de caule de <i>E. grandis</i> não tratada com DNase I.....	51
Figura 10. Reações de clivagem com a enzima de restrição <i>NcoI</i> a partir das minipreparações de pENTR/D-TOPO ligado aos <i>amplicons</i> dos genes <i>Dof</i>	52
Figura 11. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-D01698.....	53
Figura 12. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-D00607.....	54
Figura 13. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-K00405.....	55
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos da recombinação dos genes <i>Dof</i> entre o vetor de entrada pENTR/D-TOPO e o vetor binário pH7WG2D, clivados com a enzima <i>BamHI</i>	56
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos das PCRs de colônia de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 transformadas com os vetores pH7WG2D- <i>Dof</i>	57
Figura 16. Exemplo de imagem da seleção de plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas com <i>A. tumefaciens</i> EHA105::pH7WG2D- <i>Dof</i> e controle em meio seletivo com higromicina.....	60
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos das PCRs de colônia de <i>A. tumefaciens</i> EHA105 transformadas com os vetores pH7WGF2- <i>Dof</i>	61
Figura 18. Análises de localização subcelular de proteínas <i>Dof</i> fusionadas a GFP por microscopia confocal a laser em folhas de <i>N. benthamiana</i> 4 dias pós-agroinfiltração.....	63
Figura 19. Gel de agarose a 0,8% resultante da resolução dos produtos da amplificação dos três genes <i>Dof</i> ligados a pENTR/D-TOPO.....	64

Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos das PCRs de colônia de <i>E. coli</i> OmniMax 2 transformadas com as reações de ligação de pGEX-4T-1 ligado aos genes <i>Dof</i>	66
Figura 21. Mapa de cobertura do sequenciamento de pGEX-4T-1-D01698.....	66
Figura 22. Mapa de cobertura do sequenciamento de pGEX-4T-1-D00607.....	67
Figura 23. SDS-PAGE da resolução de extratos proteicos derivados da fração insolúvel oriundos de culturas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>CodonPlus-RIL</i> ::pGEX-4T-1-D01698.....	68
Figura 24. <i>Western blot</i> da proteína recombinante D01698 em extratos proteicos da fração insolúvel derivados da linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>CodonPlus-RIL</i> ::pGEX-4T-1-D01698.....	69
Figura 25. SDS-PAGE da resolução de extratos proteicos da fração solúvel oriundos de culturas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pT-GroE:: pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE:: pGEX-4T-1-D01698.	70
Figura 26. Análise por <i>western blot</i> da presença das proteínas recombinantes <i>Dof</i> em extratos proteicos da fração solúvel derivados da linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE:: pGEX-4T-1-D01698.....	71
Figura 27. SDS-PAGE e análise por <i>western blot</i> de extratos proteicos derivados da fração solúvel oriundos de culturas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE:: pGEX-4T-1-D01698 e da purificação das proteínas recombinantes <i>Dof</i>	73
Figura 28. SDS-PAGE e análise por <i>western blot</i> da purificação dos extratos proteicos derivados da fração solúvel oriundos de culturas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1-D01698.....	74
Figura S1. Mapa do vetor pXH2FS7.....	82

Lista de Abreviaturas, símbolos e unidades

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate*)

BSA: albumina sérica bovina (do inglês, *bovine serum albumin*)

°C: grau(s) Celsius

Col-0: Columbia

cDNA: DNA complementar (do inglês, *complementary DNA*)

CDS: sequência codificante de DNA (do inglês, *coding DNA sequence*)

Chip-Seq: imunoprecipitação da cromatina seguida por sequenciamento de nova geração (do inglês, *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*)

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

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

DNase: desoxirribonuclease (do inglês, *deoxyribonuclease*)

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

Dof: ligação ao DNA com um dedo (do inglês, *DNA binding with one finger*)

EtBR: brometo de etídeo

g: grama(s)

GFP: proteína verde fluorescente (do inglês, *green fluorescent protein*)

GM: geneticamente modificado(s)

GS: glucosinolatos

GST: glutationa-S-transferase

h: hora(s)

ha: hectare

HMG: grupo de alta mobilidade (do inglês, *High Mobility Group*)

IBÁ: Indústria Brasileira de Árvores

IgG: imunoglobulina G

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

ITM: motivo de tráfego intercelular (do inglês, *intercellular trafficking motif*)

kDa: quilodalton(s) (1.000 daltons)

L: litro(s)

LB: meio de cultura Luria Bertani

m³: metro cúbico

mg: miligrama(s)

min: minuto(s)

M-MLV: transcriptase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (do inglês, *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*)

mL: mililitro(s)

mM: milimolar(es)

mRNA: RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)

MS: meio de cultura de Murashige e Skoog

µg: micrograma(s)

µL: microlitro(s)

NBT: azul de nitrotetrazólio (do inglês, *nitro-blue tetrazolium*)

ng: nanograma(s)

NLS: sinal de localização nuclear (do inglês, *Nuclear Localization Signal*)

OD: densidade óptica

o/n: *overnight*

ORF: fase de leitura aberta (do inglês, *Open Reading Frame*)

pb: par(es) de bases

PBS: solução salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate Buffer Saline*)

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

pH: potencial hidrogeniônico

PVDF: fluoreto de polivinilideno

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou em tempo real (do inglês, *quantitative PCR* ou *real-time PCR*)

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

rpm: rotação(ões) por minuto

RT-PCR: PCR precedida de transcrição reversa

s: segundo(s)

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecilsulfato de sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

SNP: polimorfismo(s) de nucleotídeo único (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*)

TBS: tampão Tris-HCl salino

TE: tampão Tris-EDTA

T_m: Temperatura média de desnaturação (do inglês, *melting temperature*)

Tween 20: polioxietilenosorbitano

U: unidade(s) de atividade enzimática

V: volt(s)

Resumo

As proteínas Dof (ligação ao DNA com um dedo, do inglês, *DNA binding with One Finger*) compreendem uma família de fatores de transcrição exclusiva de plantas, caracterizadas pela presença de um domínio de ligação ao DNA semelhante ao domínio ‘dedo-de-zinco’. Estas proteínas estão associadas a diferentes processos biológicos vegetais como germinação, florescimento e outros. O objetivo principal do presente trabalho foi a caracterização funcional de três fatores de transcrição Dof de *Eucalyptus grandis* a fim de avaliar a função dos mesmos na biogênese do sistema vascular desta planta. Baseado em resultados prévios do nosso grupo, foram escolhidos três genes (EgD01698, EgD00607 e EgK00405) que apresentaram um perfil de expressão significativo em tecidos vasculares de caules de *E. grandis* e, também, alta homologia a genes *Dof* previamente caracterizados em tecidos vasculares de outros vegetais. As regiões codificadoras desses genes foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). Por recombinação, os genes foram transferidos para o vetor pH7WG2D (VIB) para expressão em *Arabidopsis thaliana*. Os genes *Dof* também foram clonados no vetor pGEX-4T-1 (GE Healthcare) para a expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Plantas de *A. thaliana* foram transformadas com os vetores binários pelo método de imersão floral e as sementes foram selecionadas com o antibiótico higromicina. Apenas duas plantas para o gene D00607 e duas para o gene K00405 foram obtidas. As plantas transgênicas estão atualmente sob cultivo para serem geradas linhagens homocigotas e, assim, caracterizadas molecularmente. Além disso, a localização subcelular foi verificada pela expressão transiente de *Dof::GFP* em folhas de *Nicotiana benthamiana*. A expressão de GFP foi detectada difusa no citoplasma e no núcleo. Entretanto, esses ensaios deverão ser repetidos para confirmação dos resultados. Em paralelo, células de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE foram transformadas com os vetores pGEX-4T-1-D01698 e pGEX-4T-1-D00607. A expressão gênica foi induzida durante 20 h a 20°C com 1 mM IPTG. As proteínas foram detectadas na fração solúvel por SDS-PAGE e *western blot* e, posteriormente, purificadas por cromatografia de afinidade. A expressão bem sucedida das proteínas Dof em *E. coli* permitirá a produção dessas proteínas para futuros estudos de caracterização funcional.

Abstract

DNA binding with one finger (Dof) proteins comprehend a family of plant exclusive transcription factors characterized by the presence of the Dof DNA binding domain whose structure is similar to the zinc finger domain. They are associated with diverse biological plant processes such as germination, flowering and many others. The aim of this work was to functionally characterize three *Dof* genes from *Eucalyptus grandis* in order to evaluate their role in the biogenesis of vascular system. Based on previous results related to the *E. grandis* *Dof* gene family studies obtained by our group, we chose three genes (D01698, D00607 and K00405) with higher expression profile in vascular tissues of *E. grandis* stalk, as well as with higher homology to *Dof* genes previously characterized as critical to the genesis of vascular tissues. The CDS of these genes were amplified by PCR and cloned into pENTR/D-TOPO entry vector (Invitrogen). Via recombination, *Dof* genes were then transferred to the pH7WG2D binary vector (VIB) for the expression in *Arabidopsis thaliana*. They were also cloned into the pGEX-4T-1 vector (GE Healthcare) for *Escherichia coli* recombinant gene expression. *A. thaliana* plants were genetically transformed with recombinant binary plasmids by the floral dip method and seeds were selected by hygromycin resistance. Only two plants for the D00607 gene and two plants for the K00405 gene were obtained. Plants are being cultivated in order to obtain homozygous individuals and they will be molecularly characterized. Additionally, subcellular localization was verified by transient expression of *Dof::GFP* in *Nicotiana benthamiana* and the expression of GFP was detected at the cytoplasm and nucleus. However, these assays need to be repeated in order to confirm the previous results. In parallel, *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE cells were transformed with pGEX-4T-1-D01698 and pGEX-4T-1-D00607. Gene expression was induced for 20 h at 20 °C with 1 mM IPTG for protein production. Proteins were detected in the soluble fraction by SDS-PAGE and western blot analysis and then were purified by affinity chromatography. The successful expression of Dof proteins in *E. coli* provides a way to produce these proteins for future functional characterization studies.

1. Introdução

1.1 A família Dof de fatores de transcrição

A família Dof (ligação ao DNA com um dedo, do inglês, *DNA binding with one finger*) compreende fatores de transcrição descritos exclusivamente em plantas, caracterizados pela presença de um motivo de ligação ao DNA do tipo dedo-de-zinco. Os fatores de transcrição Dof já foram descritos por estarem envolvidos em diferentes processos e vias metabólicas fundamentais em plantas, incluindo o desenvolvimento vascular (KONISHI & YANAGISAWA, 2007), resposta a reguladores de crescimento (KISU *et al.*, 1998), germinação de sementes (PAPI *et al.*, 2000), respostas à luz, na modulação da resposta a estresses bióticos e abióticos e outros tantos processos fundamentais de plantas (GUPTA *et al.*, 2015).

Os genes *Dof* são originários de um ancestral comum que manteve uma única cópia na alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* e se expandiu para outros grupos taxonômicos, aumentando de número por meio de eventos de duplicação (MORENO-RISUENO *et al.*, 2007). O gene ZmDOF1, isolado de milho (*Zea mays*), foi o primeiro gene *Dof* identificado e caracterizado por estar envolvido na regulação transcricional de genes associados ao metabolismo de carbono (YANAGISAWA & SHEEN, 1998; YANAGISAWA, 2001). Desde então, foram identificadas famílias de genes codificadoras de fatores de transcrição Dof em diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas tais como arroz (LIJAVETZKY *et al.*, 2003), álamo (YANG & TUSKAN, 2006), trigo (SHAW *et al.*, 2009), sorgo (KUSHWAHA *et al.*, 2011), soja (GUO & QIU, 2013), tomate (CAI *et al.*, 2013), *Arabidopsis thaliana* (GUPTA *et al.*, 2015) entre outras.

1.2 A estrutura dos fatores de transcrição Dof

Os fatores de transcrição Dof apresentam em sua estrutura um domínio conservado Dof de ligação ao DNA na porção N-terminal e uma região altamente variável na porção C-terminal da sua estrutura proteica. O domínio Dof é constituído de 52 resíduos de aminoácidos

contendo na sua estrutura quatro resíduos de cisteína (C) que se ligam a um átomo de zinco (Zn) formando uma estrutura semelhante a um dedo-de-zinco (Figura 1). Este domínio reconhece um elemento regulatório *cis* com a sequência consenso 5'-(A/T)AAAG-3' nos promotores de genes vegetais, exceto em abóbora, onde a sequência consenso de ligação ao DNA foi descrita como 5'-AAGTA-3' (UMEMURA *et al.*, 2004; YANAGISAWA & SCHMIDT, 1999). Já a região C-terminal das proteínas Dof apresenta uma alta variabilidade de sequência, o que sugere estar relacionada às diferentes funções exercidas por esses fatores (revisado em GUPTA *et al.*, 2015).

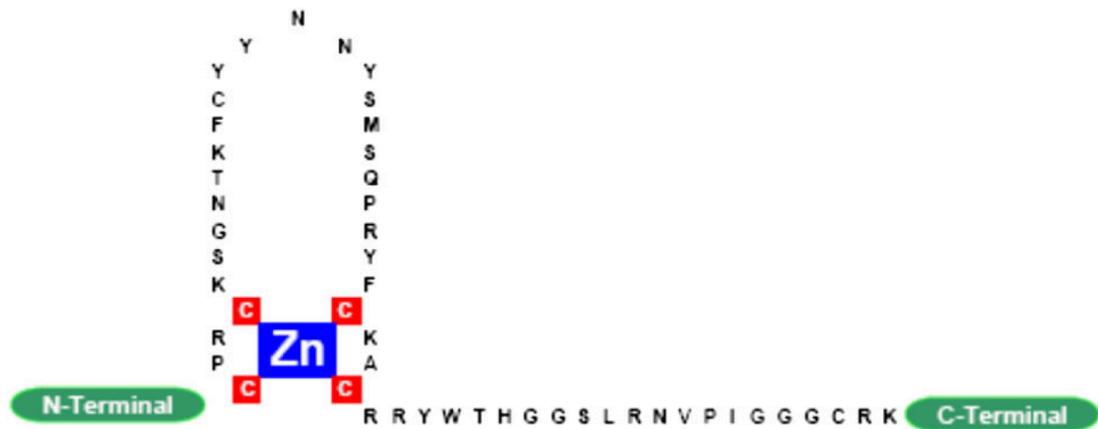


Figura 1. Estrutura do domínio Dof de *Eleusine coracana* e sua sequência de aminoácidos. Imagem adaptada de Gupta *et al.* (2015).

O domínio Dof é bifuncional, apresentando atividades de ligação ao DNA e de interação proteína-proteína. Uma vez que a sequência-alvo de ligação ao DNA é muito curta, é provável que a associação com outros fatores de transcrição forneça uma maior especificidade de ligação aos promotores dos genes-alvo. Já há descrito na literatura várias associações entre os domínios Dof e outros fatores de transcrição. Em *A. thaliana*, a proteína Dof, denominada OBP1, facilita a interação do fator de transcrição bZIP com o DNA-alvo. Em milho, a proteína denominada Dof1 interage com outra proteína Dof e com outro grupo de proteínas

denominadas HMG (grupo de alta mobilidade, do inglês, *High Mobility Group*), que apresentam sítios de ligação ao DNA de proteínas nucleares não-histonas dessa família. As proteínas HMG podem estar atuando como parceiras que auxiliam na ligação do fator Dof ao DNA. Essas interações requerem a presença do domínio Dof, porém, não requerem a ligação com o DNA. Uma mutação em um dos resíduos de cisteína necessários para a formação do dedo-de-zinco não elimina as interações Dof1-Dof2 ou Dof1-HMG (revisado em YANAGISAWA, 2004).

Os fatores Dof apresentam em sua estrutura um sinal de localização nuclear (NLS, do inglês, *nuclear localization signal*) bipartido altamente conservado entre as diferentes proteínas Dof. O NLS é caracterizado por conter um espaçamento de 17 resíduos de aminoácidos entre as regiões que constituem as sequências de localização, direcionando as proteínas Dof para o núcleo da célula (KREBS *et al.*, 2010).

1.3 Estudos funcionais das proteínas Dof

Nos últimos anos, muitos genes codificadores de fatores de transcrição Dof foram identificados e suas funções elucidadas. Em *A. thaliana*, os genes Dof AtDof2.4 e AtDof5.8 estão envolvidos na regulação do desenvolvimento vascular, nos quais são diferencialmente expressos. AtDof2.4 é detectado em células procambiais e AtDof5.8 em células de vasos de folha e no tecido vascular no desenvolvimento de botões florais (KONISH & YANAGISAWA, 2007). O sistema vascular também é o local de expressão de genes envolvidos na produção de lignina, nos quais possuem os sítios de ligação Dof em seus promotores (ROGERS *et al.*, 2005).

Em *A. thaliana*, as proteínas Dof AtDof5.6 estão envolvidas na regulação da formação do cambio interfascicular e no desenvolvimento de tecidos vasculares. A expressão de outros genes *Dof* (Dof2.1, Dof4.6 e Dof5.3) em *A. thaliana* tem sido descrita no estágio preprocambial de folhas sugerindo seus papéis no desenvolvimento preprocambial. Já a superexpressão do gene AtDof4.2 resulta em um aumento da ramificação do caule. Mutações neste gene reduzem significativamente as ramificações em plantas transgênicas (revisado em GUPTA *et al.*, 2015).

Como outro exemplo importante do papel desempenhado pelos genes *Dof*, esses fatores atuam controlando a regulação da germinação de sementes. Assim, a proteína Dof de *A. thaliana* DOG1 (atraso na germinação, do inglês, *Delay of Germination 1*) atua como um regulador chave no processo de dormência das sementes. A expressão de DOG1 leva a um aumento nos níveis de dormência (NAKABAYASHI *et al.*, 2015).

As proteínas Dof estão também associadas a respostas a estresses bióticos e abióticos. O gene *Dof* de *A. thaliana* OBP2 está envolvido em respostas a estresses bióticos, regulando o metabolismo de glucosinolatos (GS). Os GS são um grupo de metabólitos secundários que agem como substâncias de defesa contra herbívoros e microorganismos em plantas da ordem *Capparales*, incluindo *A. thaliana* e espécies de culturas economicamente importantes como a colza (*Brassica napus*). A proteína é expressa durante a formação de todos os órgãos de *A. thaliana* incluindo folhas, raízes, talos de flores e pétalas e sua expressão é induzida em resposta ao herbívoro generalista *Spodoptera littoralis* e pelo tratamento com a molécula metiljasmonato (SKIRYCZ *et al.*, 2006).

Em estresses abióticos, o gene *Dof* CDF3 de *A. thaliana* é altamente induzido por seca, temperaturas extremas e tratamento com ácido abscísico. O mutante *cdf3-1* de *A. thaliana* é muito mais sensível à seca e a estresses de baixa temperatura, enquanto que a superexpressão de CDF3 aumenta a tolerância das plantas transgênicas à seca, ao estresse osmótico e ao frio, além de promover o atraso da floração. A análise do transcrito revelou que CDF3 regula um conjunto de genes envolvidos na osmoproteção celular e no estresse oxidativo, incluindo os fatores de transcrição de tolerância ao estresse CBFs, DREB2A e ZAT12 (CORRALES *et al.*, 2017). Até o presente momento, à parte dos trabalhos e comunicações de nosso próprio grupo de pesquisa (D'ALMEIDA, 2014), nenhuma informação acerca de fatores de transcrição Dof de árvores do gênero *Eucalyptus* está disponível na literatura.

1.4 O Gênero *Eucalyptus*

As árvores do gênero *Eucalyptus* pertencem à família *Myrtaceae* e são nativas da Austrália, do Timor e da Indonésia, sendo exóticas no resto do mundo. O gênero inclui mais de 800 espécies e mais de 3.000 híbridos, os quais correspondem majoritariamente a arbóreas

florestais. Dentre os principais países com áreas plantadas de *Eucalyptus* destacam-se Brasil, Índia, África do Sul, Espanha, Portugal, Chile, Argentina e China (ENCE, 2009). No Brasil, o plantio de *Eucalyptus* começou no século XIX quando as primeiras mudas chegaram ao Rio Grande do Sul. Atualmente, as principais espécies plantadas no Brasil são *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. saligna*, *E. urophylla* e *E. dunnii*, entre outras. Além destas espécies puras, também foi realizado o cruzamento para a geração de híbridos como é o caso do “*Eucalyptus urograndis*” (*E. urophylla* x *E. grandis*; revisado em LERAYER, 2009).

O plantio de *Eucalyptus* no Brasil e no resto do mundo é extremamente importante devido às inúmeras aplicações e utilizações da sua madeira. As toras de eucalipto têm sido empregadas, principalmente, na produção de celulose para a fabricação de papel, para o uso de madeira sólida na construção civil (estacaria) e postes, na indústria moveleira, na produção de madeira industrializada e na obtenção de lenha e de carvão vegetal para geração de energia térmica e elétrica (MORA, 2000). Além disso, a partir do eucalipto podem ser extraídos óleos essenciais com os quais são fabricados alimentos, produtos de limpeza, perfumes e remédios (CIBIO, 2008).

De acordo com o relatório do ano de 2016 publicado pela Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ), o Brasil liderou o *ranking* global de produtividade florestal, com uma média de 35,7 m³/ha ao ano para os plantios de eucalipto. A plantação de eucalipto ocupa 5,7 milhões de ha, o que representa 72 % do total das árvores plantadas, e estão localizados principalmente nos estados de Minas Gerais (24 %), de São Paulo (17 %) e do Mato Grosso do Sul (15 %) (IBÁ, 2017).

1.5 *Eucalyptus* como alvo de melhoramento genético

Devido à relevância econômica e social das árvores de *Eucalyptus*, estratégias de melhoramento genético têm sido empregadas para a geração de plantas ainda mais produtivas. Um dos principais objetivos no melhoramento genético do eucalipto é incrementar as características genéticas desejáveis para o maior rendimento do conteúdo de celulose, para a fabricação de papel. No Brasil, a espécie *E. grandis*, principalmente na forma de híbridos *E. grandis* x *E. urophylla*, é a mais visada para a produção de papel e de pasta de celulose

(MOKFIENSKI & COLODETTE, 2008). Esta espécie, além de possuir um ótimo conteúdo de celulose, apresenta rápido crescimento volumétrico e resistência a pragas, tornando-se ideal para estudos de caracterização genética e, conseqüentemente, identificação e isolamento de genes responsáveis por várias características de interesse comercial e agrônômico.

No entanto, o melhoramento convencional dessas espécies apresenta algumas limitações como é o caso da incompatibilidade sexual, da redução do *pool* gênico e o ciclo de vida longo, tornando este processo de cruzamentos e seleção bastante demorado. Assim, a transformação genética mostra-se como uma grande aliada na obtenção de árvores com características gênicas de interesse. Árvores geneticamente modificadas (GM) podem ser desenvolvidas para uma melhor qualidade da madeira, para a redução de produtos químicos necessários para a extração de celulose, para a geração de árvores mais resistentes e adaptadas, dentre outros. Estas características podem levar a um aumento considerável na produção e, também, na redução do impacto ambiental do processamento industrial (SARTORETTO *et al.*, 2008).

Em abril de 2015, foi aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) a liberação comercial da primeira árvore de *Eucalyptus* GM. Esta árvore GM foi desenvolvida pela empresa FuturaGene, subsidiária da Suzano Papel & Celulose. As árvores GM aprovadas para plantio comercial são derivadas do evento H421 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Estas árvores GM expressam duas proteínas recombinantes, Cell1 e NPTII. A proteína Cell1, cujo gene codificador é proveniente de *A. thaliana*, é uma enzima β -endoglicanase que promove o relaxamento da parede celular, permitindo maior acúmulo de celulose e, por conseguinte, maior rendimento neste polímero; já a proteína NPTII ou neomicina fosfotransferase II (do inglês, *neomycin phosphotransferase II*) confere resistência a antibióticos aminoglicosilados como neomicina e derivados (canamicina, paromomicina, gentamicina), necessários para a seleção das plantas transformadas (CTNBio, 2014).

A produção florestal e de madeira tornam o eucalipto a árvore mais adequada para a produção de celulose e energia renovável. Desse modo, recentes avanços nas áreas de genômica e proteômica têm permitido um melhor entendimento acerca dos processos biológicos da formação de madeira nos níveis de genes e proteínas. A madeira (xilema secundário) é formada por uma sucessão de cinco etapas principais incluindo divisão celular,

expansão celular, espessamento da parede celular, morte celular programada e, finalmente, a formação do cerne. Análises de transcrito em espécies de árvores revelaram que um conjunto de genes, incluindo fatores de transcrição e genes de biossíntese da parede secundária, são altamente expressos em células formadoras de madeira (revisado em PLOMION *et al.*, 2001). Assim, como um exemplo de fator Dof envolvido na gênese da madeira, foi relatado que o gene Dof5.6/HCA2 desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento do tecido vascular atuando como um regulador positivo para a formação do câmbio interfascicular durante o desenvolvimento do tecido vascular em *Arabidopsis* (GUO *et al.*, 2009). Assim, esses estudos representam um importante avanço no entendimento a nível molecular da formação do câmbio vascular de árvores que podem ser utilizados para a produção de árvores transgênicas com uma melhor qualidade da madeira.

2. Justificativa

Considerando que a madeira justifica a grande importância econômica do eucalipto (e de outras arbóreas) e que até o presente momento nenhuma informação acerca de fatores de transcrição Dof de árvores do gênero *Eucalyptus* está disponível na literatura, genes *Dof* de *E. grandis* criticamente associados com o desenvolvimento vascular e à biogênese da madeira foram o alvo principal do presente estudo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral que norteou o desenvolvimento deste trabalho foi a caracterização funcional de três fatores de transcrição da família de genes *Dof* de *E. grandis*.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar gene(s) *Dof* de *E. grandis* potencialmente envolvidos na gênese da madeira;
2. Clonar gene(s) *Dof* de interesse e expressar em *E. coli* e *A. thaliana*;
3. Expressar os fatores transcricionais *Dof* em *A. thaliana*;
4. Investigar a localização subcelular dos fatores transcricionais *Dof*;
5. Caracterizar bioquimicamente e funcionalmente as proteína(s) *Dof* recombinante(s).

4. Materiais e Métodos

4.1 Identificação de gene(s) *Dof* de *E. grandis* potencialmente críticos à gênese da madeira

Para a realização dos estudos de caracterização funcional, foram analisados e eleitos três genes *Dof* com perfil de expressão transcricional preferencial em tecidos vasculares de caules de *E. grandis*, a partir de ensaios de RT-qPCR dos genes *Dof* de *E. grandis* realizados previamente por D'ALMEIDA (2014).

4.2 Projeção e síntese de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para as sequências codificadoras dos genes *Dof*

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram projetados conforme as sequências dos genes *Dof* de *Eucalyptus* previamente determinadas por D'ALMEIDA (2014) e depositadas no banco de dados *Plant Transcription Factor Database* conforme apresentadas no item 7.1 do Material Suplementar da seção 7.0. As sequências dos *primers* foram avaliadas utilizando-se o *software online Oligo Analyzer 3.1* (IDT, <http://www.idtdna.com>), através do qual foram analisadas as temperaturas médias de desnaturação (T_m) e os parâmetros como estabilidade de estruturas secundárias resultantes de autoanelamento, homo- e heterodimerização. A sequência CACC foi incluída na extremidade 5' das sequências dos *primers forward* para posterior ligação dos insertos ao plasmídeo de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen), por ação da topoisomerase I. Os *primers* foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT), representada no Brasil pela empresa Síntese Biotecnologia Ltda. (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências e temperaturas médias de desnaturação (T_m) dos *primers* projetados para as regiões codificantes dos genes *Dof*. Em negrito estão indicados os códons de início e de término e, sublinhados, os sítios de ligação para ação da topoisomerase I e ligação de insertos no vetor pENTR/D-TOPO.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	T_m (°C)
D01698-For	<u>CACC</u> ATG GAC ACC GCT CAG TGG CC	62,6
D01698-Rev	TTA CCA CGA TCC GCC ACC CAA CAT C	63,0
D00607-For	<u>CACC</u> ATG GAG CAA GAG AGC AAG CCA CCG	63,5
D00607-Rev	TTA TGG AGG AGG GCC AAA TCC TGG AAG ATG	62,9
K00405-For	<u>CACC</u> ATG GAC AAC GCA GCC CCA TCT CAG	63,4
K00405-Rev	TCA CCA TGA TCC TCC AGT GCC CAG	62,7

4.3 Extração de ácidos nucleicos de *E. grandis*

As amostras de tecido vascular de caules de *E. grandis* foram previamente obtidas (D'ALMEIDA, 2014) e mantidas à -20 °C. Assim, foi realizada a extração de DNA e de RNA total a partir destas amostras, utilizando-se o método de extração modificado de DOYLE & DOYLE (1987), conforme detalhado em DE OLIVEIRA *et al.* (2012). A integridade e a quantidade das amostras de RNA e de DNA foram monitoradas por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % e por espectrofotometria utilizando-se o equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

4.4 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. Analisou-se a qualidade das amostras tratadas com DNase I por eletroforese em gel

de agarose a 1,5 %, aplicando-se 30 μL do RNA tratado com DNase I e 5 μL da amostra original de RNA total para comparação. Além disso, as amostras de RNA tratadas com DNase I foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

A síntese de cDNA foi realizada a partir de amostra de RNA total tratada com DNase I, seguindo-se protocolo padrão da *Biolabs* para a enzima *M-MuLV RT*. Desse modo, os componentes e quantidades da síntese de cDNA foram: 4,8 μL de água purificada (MiliQ) e autoclavada; 2 μL de dNTP (5 mM); 1,2 μL do *primer reverse* gene-específico (100 μM); 4 μL de RNA molde (50 ng/ μL) totalizando 10 μL . A mistura de reação foi submetida por 5 min a 65 °C para desnaturação dos ácidos nucleicos. O restante dos reagentes foram adicionados: 6,8 μL de água MiliQ autoclavada; 2 μL de tampão *M-MuLV* 10 X; 0,2 μL de inibidor de RNase (40 U/ μL) e 1 μL da enzima *M-MuLV RT* (200 U/ μL). A reação foi incubada a 42 °C durante 1 h e a enzima foi inativada por 20 min a 65 °C. O produto de cDNA foi armazenado a -20 °C.

A reação em cadeia da DNA Polimerase (PCR) foi realizada para checar a síntese de cDNA dos genes D1698, D00607 e K00405 utilizando-se o termociclador LGC XP *Cycler* (*Bioer Technology*) e o programa conforme representado na Tabela 2. A reação foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 10 μL de tampão *Colorless GoTaq Flexi Buffer* 5 X; 3 μL de MgCl_2 (25 mM); 2,5 μL de BSA (10 mg/mL); 2 μL de dNTPs (5 mM); 2 μL de *primer forward* gene-específico (10 μM) e de *primer reverse* gene-específico (10 μM ; Tabela 1); 0,5 μL de *GoTaq Hot Start DNA Polymerase* (5 U/ μL ; Promega); 3 μL de cDNA (10 ng/ μL) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 50 μL . Para a análise dos produtos amplificados, 5 μL dos *amplicons* foram aplicados em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g/mL}$ e submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

Tabela 2. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes *Dof*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação Inicial	94	4	1
Desnaturação	94	0,5	30
Anelamento	57	0,5	30
Síntese	72	1	30
Síntese Final	72	5	1

Como não se obteve êxito na amplificação dos cDNAs realizados anteriormente, uma nova tentativa de síntese de cDNA foi realizada utilizando *primer* oligo(dT) a partir de amostra tratada e não trada com DNase I, seguindo-se o protocolo padrão da *Biolabs* como citado anteriormente. Desse modo, os componentes da síntese de cDNA foram: água MiliQ autoclavada para um volume final de 10 μL ; 2 μL de dNTP (5 mM); 1 μL de oligo(dT) (100 μM); 4 μL de amostra de RNA total tratada com DNase I (50 ng/ μL) e 2 μL (528 ng/ μL) de amostra não tratada. A reação foi desnaturada por 5 min a 65 °C. O restante dos reagentes foram adicionados: 6,8 μL de água MiliQ autoclavada; 2 μL de tampão *M-MuLV* 10X; 0,2 μL de inibidor de RNase (40 U/ μL) e 1 μL da enzima *M-MuLV RT* (200 U/ μL). A reação foi incubada a 42 °C durante 1 h e a enzima foi inativada por 20 min a 65 °C. O produto de cDNA foi armazenado a -20 °C.

PCRs foram realizadas para avaliar o sucesso de síntese de cDNA conforme protocolo e programa utilizados anteriormente. Para a análise dos produtos amplificados, 5 μL dos *amplicons* foram aplicados em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

Para uma maior fidelidade de amplificação das sequências codificantes, PCRs foram realizadas com a enzima *Pfu DNA Polymerase* (Promega) a partir de amostra de cDNA não tratado com DNase I, utilizando-se protocolo conforme orientações do fabricante. A reação foi realizada contendo 5 μL de tampão *Pfu Buffer* 10 X com MgSO_4 ; 2 μL de dNTPs (5 mM); 2 μL de *primer forward* gene-específico (10 μM) e 2 μL de *primer reverse* gene-específico (10 μM); 1 μL de *Pfu DNA Polymerase* (3 U/ μL , Promega); 3 μL de cDNA (10 ng/ μL) e água

MiliQ autoclavada para um volume final de 50 μ L. O termociclador LGC XP *cycler* (Bioer Technology) foi utilizado com o programa indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes *Dof* a partir de *Pfu* DNA Polymerase.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação Inicial	95	2	1
Desnaturação	95	1	30
Anelamento	57	0,5	30
Síntese	72	2	30
Síntese Final	72	5	1

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 μ g/mL e os fragmentos de tamanhos esperados foram removidos do gel para posterior purificação com o *kit* de purificação de DNA *Purification Kit* (Ludwig Biotech). As amostras purificadas foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

4.5 Clonagem das sequências codificadoras dos genes *Dof* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO e confirmação de clones positivos

As sequências codificantes de DNA (CDS, do inglês, *coding DNA sequences*) dos genes D01698, D00607 e K00405, obtidas por meio das PCRs, foram inseridas ao vetor de entrada pENTR/D-TOPO segundo *kit* e instruções da *Gateway Recombinant Cloning with TOPO Technology* (Figura 2; Invitrogen/Thermo Fisher Scientific). Dessa forma, a clonagem direcional foi catalisada pela ação da enzima Topoisomerase I conjugada ao vetor de entrada.

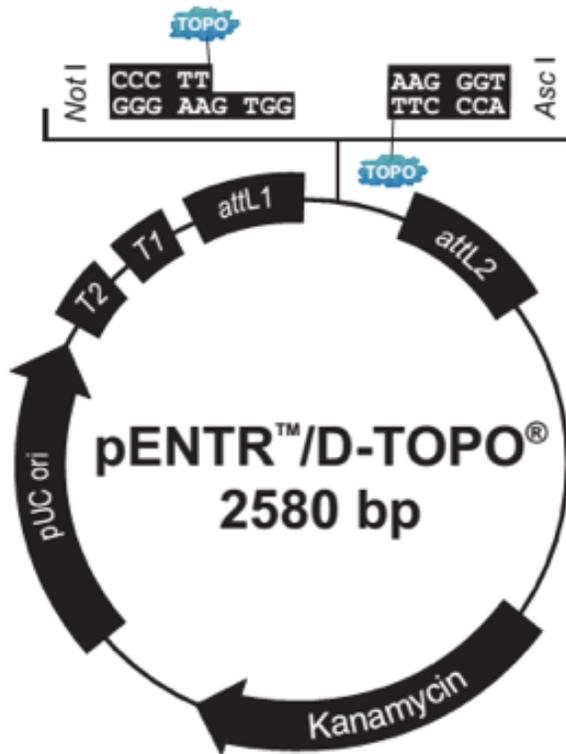


Figura 2. Mapa do vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen). TOPO, enzima Topoisomerase I; *attL1* e *attL2*, sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse a partir do vetor de entrada para vetores de destino do sistema Gateway®; *Kanamycin*, gene de resistência ao antibiótico canamicina para seleção de transformantes em bactérias; pUC ori, origem de replicação em bactérias; T1 e T2, sequências de término de transcrição; NotI e AscI, sítios para endonucleases (Fonte: www.invitrogen.com).

Para as reações de clonagem das CDS dos genes no vetor pENTR/D-TOPO, utilizaram-se os seguintes componentes: 1,4 µL do produto de PCR (5 ng/µL); 1 µL da solução salina, 1 µL de pENTR/D-TOPO (15-20 ng/µL) e água MiliQ autoclavada para o volume final de 6 µL. As reações de ligação foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min e, após, armazenadas a -20 °C. As quantidades utilizadas de vetor e de *amplicon* para as reações foram calculadas para totalizar proporção molar de 1:1.

Após, células termocompetentes de *E. coli One Shot® Mach1™ T1* (Invitrogen) foram geneticamente transformadas por choque-térmico com 2 µL da reação de clonagem, seguindo o protocolo “*Transforming One Shot® Competent E. coli* (Invitrogen)”. Depois da

transformação, 200 µL e o material concentrado das suspensões bacterianas foram plaqueados com alça de Drigalski em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido contendo 50 mg/L de canamicina e mantidas em estufa por 37 °C *overnight* (*o/n*).

As colônias obtidas pelas transformações foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB com canamicina por 37 °C *o/n* e agitação de 180 rotações por min (rpm). As minipreparações de plasmídeos foram realizadas utilizando-se o método de lise alcalina descrito por BIMBOIM & DOYLE (1979) com modificações de JONES & SCHOFIELD (1990). As amostras foram quantificadas em Nanodrop (Thermo Scientific).

Para a confirmação dos clones positivos, as minipreparações plasmidiais foram submetidas a reações de clivagem com a enzima de restrição NcoI (*NE Biolabs*), conforme a reação: 2 µL de tampão 3 10 X (*NE Biolabs*); 2 µL de plasmídeo minipreparado, 1 µL da enzima NcoI (10 U/µL); 1 µL de RNase A (250 mg/mL) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada à 37 °C por 1,5 h. Após, os volumes totais das digestões foram aplicados em gel de agarose a 0,8 %, corado com EtBr a 0,01 µg/mL e submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

4.6 Sequenciamento dos genes de interesse clonados em pENTR/D-TOPO e purificação das minipreparações plasmidiais

A confirmação da integridade das sequências dos genes nos vetores de entrada pENTR/D-TOPO foi realizada por sequenciamento de DNA plasmidial realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa *SnapGene*.

Placas de Petri contendo LB sólido acrescido de 50 mg/L de canamicina foram preparadas por esgotamento a partir das culturas líquidas remanescentes das minipreparações plasmidiais dos clones positivos de pENTR/D-TOPO-D01698, pENTR/D-TOPO-D00607 e pENTR/D-TOPO-K00405. As colônias isoladas foram inoculadas para a realização da purificação das minipreparações plasmidiais utilizando o *Plasmid Mini Purification Kit* (Ludwig Biotech).

4.7 Ensaios de expressão dos genes *Dof* em *A. thaliana*

4.7.1 Recombinação das seqüências codificadoras *Dof* no vetor de destino pH7WG2D e seleção de clones positivos

Os insertos das CDS dos genes *Dof* em pENTR/D-TOPO foram transferidos por recombinação (*Gateway LR Clonase TM II Enzyme Mix Recombination System*, Invitrogen/Thermo Fisher Scientific) para o vetor binário pH7WG2D (VIB, Figura 3) com vistas à expressão dos genes *Dof* em *A. thaliana* (KARIMI *et al.*, 2002; KARIMI *et al.*, 2007).

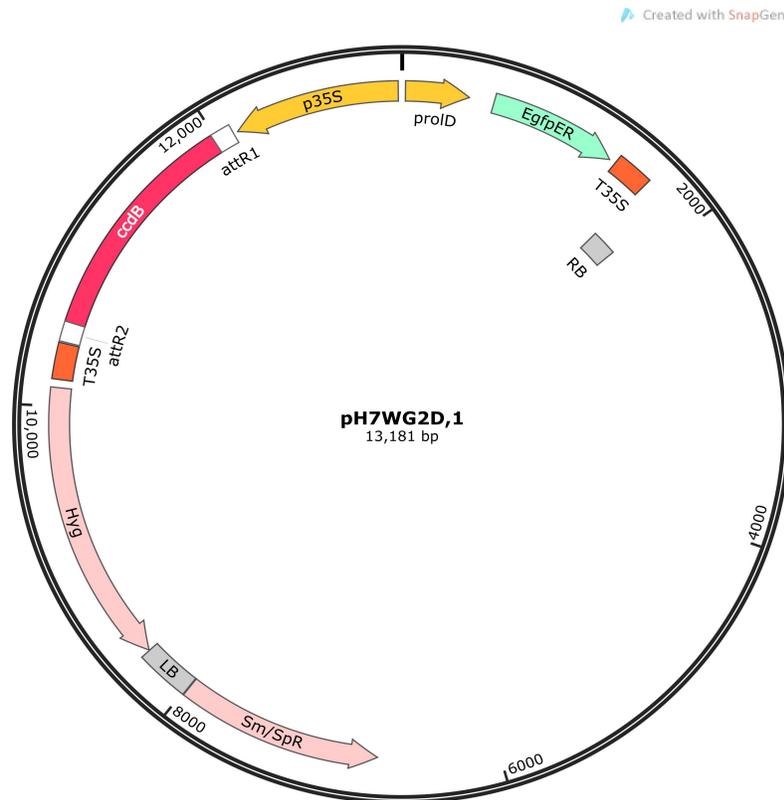


Figura 3. Mapa do vetor binário pH7WG2D,1 (VIB). Imagem gerada pelo programa *SnapGene 2.5* a partir da seqüência original de nucleotídeos de pH7WG2D,1. Sítios *attR1* e *attR2*, seqüências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; *Sm/SpR*, gene de resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina, possibilitando a seleção de bactérias recombinantes; *Hyg*, gene de resistência ao antibiótico higromicina para seleção de transformantes em plantas; *p35S*, promotor 35S do vírus-do-mosaico-da-couve-flor (CaMV); *ccdB* (do inglês, *control of cell death B*), gene codificador da proteína bloqueadora da DNA *gyrase*; *EgfpER*, gene que codifica a proteína repórter GFP que é expresso sob o controle do promotor *proID* específico de *A. rhizogenes* e do terminador 35S do CaMV (*T35S*); *RB* e *LB*, representam as bordas direita (“*right border*”) e esquerda (“*left border*”) do T-DNA. (KARIMI *et al.*, 2002).

A reação de recombinação de cada gene foi realizada contendo 1 µL de cada construção a 150 ng/µL de pENTR/D-TOPO-D01698, pENTR/D-TOPO-D00607 ou pENTR/D-TOPO-K00405 para 3,6 µL do vetor de destino pH7WG2D (40 ng/µL) em 3,4 µL de TE 1 X, pH 8. A seguir, 2 µL da enzima *LR Clonase II* foi adicionada à reação e a mesma foi incubada a 25 °C *o/n*. Por fim, 1 µL de proteinase K (Invitrogen) foi adicionado à mistura e a mesma foi incubada por 37 °C durante 10 min para o término da reação.

Seguiu-se com a transformação de *E. coli One Shot[®] Mach1[™] TI* utilizando-se 2 µL do produto das reações de recombinação, conforme instruções do fabricante. Após a transformação, 200 µL e o material concentrado das suspensões bacterianas foram plaqueados com alça de Drigalski em placas de Petri com meio de cultura LB sólido contendo 100 mg/L de espectinomicina. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C *o/n*.

As colônias resultantes da transformação com os produtos da recombinação de cada gene foram inoculadas em 1,5 mL de meio LB contendo 100 mg/L de espectinomicina. As culturas foram mantidas *o/n* à 37 °C e 180 rpm. Assim, minipreparações plasmidiais foram realizadas.

Para a confirmação dos clones positivos, as minipreparações plasmidiais foram submetidas a reações de clivagem com a enzima de restrição BamHI (Promega), conforme a reação: 2 µL de tampão E 10X (Promega); 2 µL de plasmídeo minipreparado, 1 µL da enzima BamHI (10 U/µL); 1 µL de RNase A (250 mg/mL); 0,2 µL de BSA (10 µg/µL, Promega) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada à 37 °C por 1,5 h. Após, os volumes totais das digestões foram aplicados em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 µg/mL e submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

4.7.2 Transformação genética de *A. tumefaciens* EHA105 e seleção de clones positivos

A inserção dos plasmídeos pH7WG2D-D01698, pH7WG2D-D00607 e pH7WG2D-K00405 em células termocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foi realizada por transformação genética via choque-térmico. Utilizou-se 100 µL de células termocompetentes e 5 µL de cada construção conforme protocolo descrito por BRASILEIRO E CARNEIRO (1998). Assim, 100 µL da suspensão bacteriana foram distribuídos com alça de Drigalski em

placa de Petri com meio LB contendo os antibióticos rifampicina a 50 mg/mL e espectinomomicina a 100 mg/mL. As placas permaneceram por 48 h à 28 °C até a obtenção de colônias.

PCRs de seis colônias isoladas de *A. tumefaciens* EHA105 foram realizadas para checar a presença do plasmídeo binário pH7WG2D com os genes clonados D01698, D00607 e K00405 em *A. tumefaciens* EHA105. A reação foi realizada contendo 10 µL de tampão *Colorless GoTaq Flexi Buffer 5X* (Promega); 3 µL de MgCl₂ (25 mM); 2 µL de dNTPs (5 mM); 2 µL de *primer forward* gene-específico (10 µM) e *primer reverse* gene-específico (10 µM); 0,5 µL de *GoTaq Hot Start DNA Polymerase* (5 U/µL; Promega) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 50 µL. Como controle positivo, utilizou-se as minipreparações plasmidiais das recombinações dos clones positivos diluídos em 20 ng/µL. A reação foi realizada no termociclador LGC XP *Cycler* (*Bioer Technology*) e o programa utilizado está representado na Tabela 2. Para a análise dos produtos amplificados, 5 µL dos *amplicons* foram aplicados em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 µg/mL. O gel foi submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

4.7.3 Cultivo de *A. thaliana*

Utilizou-se plantas de *A. thaliana* do ecótipo Columbia 0 para os experimentos de transformação genética de plantas. As sementes de *A. thaliana* foram gentilmente cedidas pelas Dra. Márcia M.A.N. Pinheiro Margis e Dra. Fernanada Lazzarotto (Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS) mantidas em sacos de papel sob refrigeração à 4 °C. As sementes selvagens (*wild-type*) foram semeadas em pequenos vasos plásticos contendo solo do tipo turfa (*Garden Plus*) previamente peneirado e autoclavado. As sementes foram estratificadas a 4 °C por 3 dias no escuro. Após, os vasos foram dispostos em bandejas plásticas contendo uma lâmina baixa de água destilada repostada semanalmente durante o período de cultivo, permanecendo em câmara de crescimento a 22 °C sob fotoperíodo longo (16 h de luz e 8 h de escuro). A bandeja permaneceu coberta com filme plástico tipo PVC durante os primeiros 10 dias de cultivo para proporcionar um ambiente úmido ideal para o estabelecimento das plântulas.

4.7.4 Transformação genética de *A. thaliana* com vetor binário capaz de promover a expressão dos genes *Dof*

As plantas de *A. thaliana* Col-0 foram geneticamente transformadas pelo método de imersão de inflorescências (*floral dip*) pela suspensão de *A. tumefaciens* EHA105 conforme descrito por ZHANG *et al.* (2006). Um total de quatro transformações independentes foram realizadas contendo *A. tumefaciens* EHA105 armadas alternativamente com os plasmídeos pH7WG2D-D01698, pH7WG2D-D00607, pH7WG2D-K00405 ou pH7WG2D (controle).

Após a transformação genética, as plantas permaneceram em câmara de crescimento nas condições descritas no item 4.7.3 até completo desenvolvimento e maturação de siliquis e sementes. Depois desse período, a irrigação das plantas foi reduzida para a dessecação completa das sementes e coleta das mesmas.

4.7.5 Seleção de plantas transgênicas de *A. thaliana*

A manipulação de meios de cultivo e material vegetal de cultura *in vitro* foram executadas em cabine de fluxo laminar horizontal modelo PA200 (Pachane). Após a transformação genética das plantas de *A. thaliana*, as sementes (T₁) foram obtidas e submetidas a antissepsia superficial. Para isso, sementes T₁ e selvagens de *A. thaliana* foram descontaminadas seguindo-se o seguinte protocolo: imersão no fungicida Dithane a 5 mg/mL durante 20 min, álcool 70 % por 1 min e hipoclorito de sódio a 5 % por 10 min. As sementes foram lavadas pelo menos 5 vezes com água MiliQ autoclavada até a completa eliminação do hipoclorito e dispostas em papel filtro para completa secagem. Após a antissepsia, as sementes foram dispostas em placas de Petri contendo meio de MURASHIGE & SKOOG (MS; 1963) acrescido de ágar a 6 % com 100 mg/L de cefotaxima e higromicina testada nas concentrações de 25 e 15 mg/L.

4.8 Ensaio de localização subcelular dos genes *Dof*

4.8.1 Análise *in silico* da localização subcelular dos genes *Dof*

A localização subcelular dos fatores de transcrição *Dof* foram previstas utilizando-se o banco de dados *Plant-mPLOC database* ([http:// www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#](http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#)).

4.8.2 Transformação genética de *A. tumefaciens* e seleção de clones positivos das transformações com o vetor binário pH7WGF2-*Dof*

A sequência codificadora de cada gene *Dof*, previamente clonada em pENTR/D-TOPO, foi utilizada para a construção de fusões com a proteína de fluorescência verde (GFP, do inglês, *green fluorescent protein*) N-terminal, a partir da clonagem *Gateway* (Invitrogen) no vetor binário pH7WGF2 (VIB) contendo o gene da GFP (Figura 4). A reação de recombinação entre o inserto do vetor de entrada para o de destino ocorreu conforme reação descrita no item 4.7.1, porém, utilizando-se o vetor pH7WGF2.

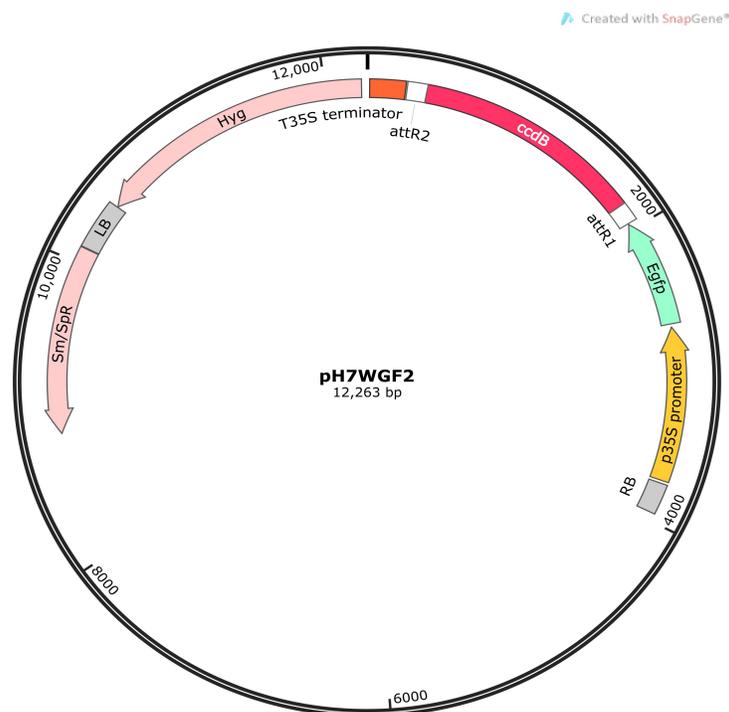


Figura 4. Mapa do vetor binário pH7WGF2,1 (VIB). Imagem gerada pelo programa *SnapGene 2.5* a partir da sequência original de nucleotídeos de pH7WGF2,1. Sítios *attR1* e *attR2*, sequências que permitem a recombinação específica do gene de interesse com o plasmídeo de entrada; *Sm/SpR*, gene de resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina, possibilitando a seleção de bactérias recombinantes; *Hyg*, gene de resistência ao antibiótico higromicina para seleção de transformantes em plantas; *ccdB* (do inglês, *control of cell death B*), gene codificador da proteína bloqueadora da DNA *gyrase*; *EgfpER*, gene que codifica a proteína repórter GFP em fusão ao gene *ccdB* expresso sob o controle do promotor p35S do vírus-do-mosaico-da-couve-flor (CaMV) e do terminador T35S; RB e LB, representam as bordas direita (“*right border*”) e esquerda (“*left border*”) do T-DNA. (KARIMI *et al.*,2002).

Após a transformação e a confirmação da clonagem dos genes *Dof* no vetor binário pH7WGF2 conforme item 4.7.1, células de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas via choque-térmico com as construções pH7WGF2-*Dof* (pH7WGF2-D01698; pH7WGF2-D00607 e pH7WGF2-K00405) e as transformações verificadas como descrito no item 4.7.2. Para o controle positivo da expressão de GFP, células de *A. tumefaciens* foram transformadas com os vetores vazios pH7WGF2 e pXH2FS7 (VIB; Figura S1).

4.8.3 Agroinfiltração

A realização do ensaio de localização subcelular foi realizado a partir do protocolo adaptado de SPARKES *et al.* (2006). Para o ensaio de agroinfiltração, folhas de *Nicotiana benthamiana* selvagem com mais de seis semanas e mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e 8 horas de escuro foram agroinfiltradas para os ensaios de localização subcelular. As agrobactérias contendo o cassete de expressão descrito no item 4.8.2 foram utilizadas para a agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* (Figura 5). Após a agroinfiltração, as plantas foram mantidas a 22 °C com fotoperíodo de 16 h durante quatro dias antes das análises de fluorescência.



Figura 5. Imagem representativa do método de agroinfiltração de folhas de *N. benthamiana* com *A. tumefaciens* EHA105 armadas com os genes de interesse *Dof*.

4.8.4 Ensaio de fluorescência

Os sinais de fluorescência foram observados em um microscópio de fluorescência confocal Olympus FV1000, no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS.

4.9 Expressão heteróloga de genes *Dof* em *E. coli*

4.9.1 Projeção de *primers Dof*-específicos para as etapas de clonagem molecular no vetor pGEX-4T-1

O plasmídeo de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare; Figura 6) foi escolhido para a expressão recombinante dos genes *Dof* em *E. coli* pois permite a adição de uma cauda de glutationa S-transferase (GST) na porção N^o terminal das proteínas *Dof*, facilitando as etapas de purificação das proteínas de interesse. Para isso, as enzimas de restrição escolhidas para a clivagem e posterior clonagem dos genes *Dof* no vetor de expressão foram BamHI e EcoRI

(Promega), permitindo a continuidade das fases de leitura das sequências codificadoras *Dof* com GST.

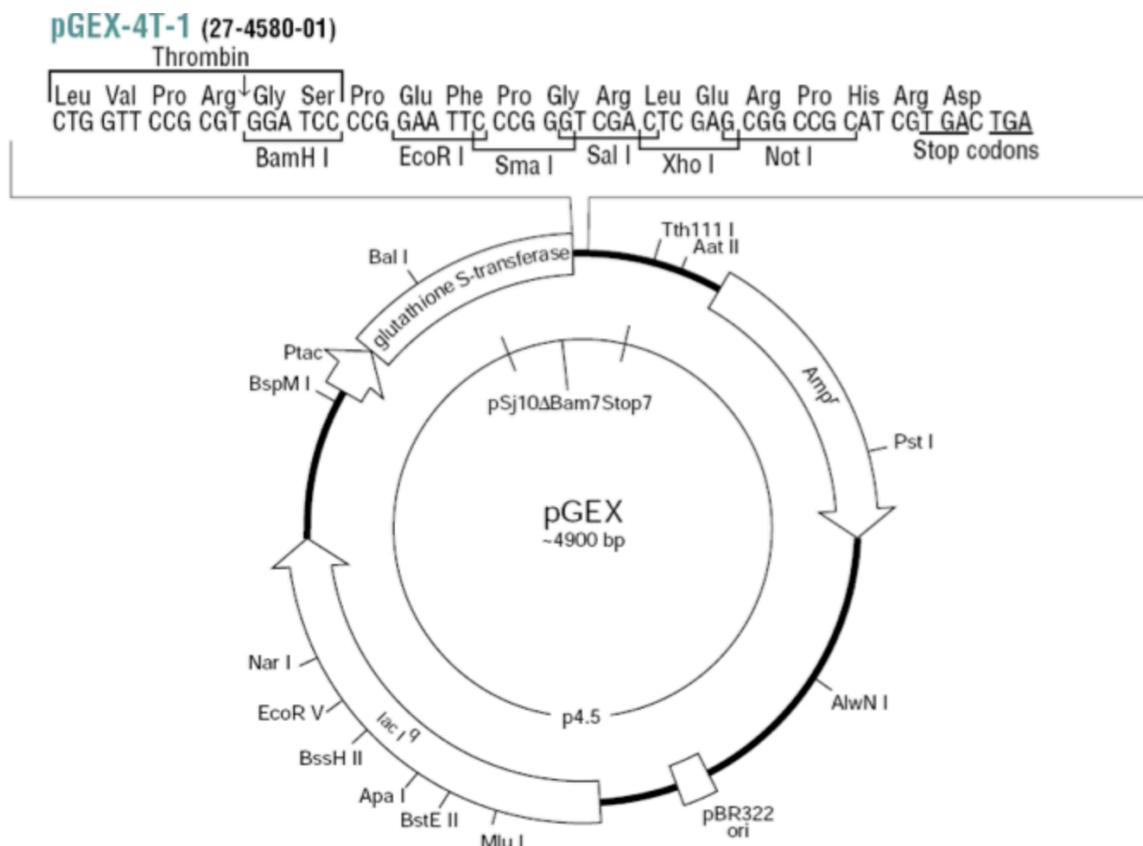


Figura 6. Mapa do vetor de expressão pGEX-4T-1 (GE Healthcare). Na imagem, está indicado o sítio de multiclonagem na versão do pGEX-4T-1, além do sítio de clivagem proteolítica por trombina (*Thrombin*). A região indicada por $lacI^q$ corresponde ao gene codificante para a proteína repressora que se liga à região operadora do promotor Ptac, prevenindo a expressão do gene codificador da glutathione S-transferase sem o indutor IPTG. Amp^r , gene de resistência ao antibiótico ampicilina; *glutathione S-transferase*, região codificante para a proteína glutathione-S-transferase (GST, *tag* para purificação). Fonte: manual do fabricante GE Healthcare.

Os *primers Dof*-específicos foram projetados a fim de conter em suas sequências sítios de reconhecimento das enzimas de restrição EcoRI e BamHI, permitindo a clonagem direcional dos fragmentos no vetor de expressão pGEX-4T-1. Os *primers* foram projetados utilizando-se o *software online Oligo Analyzer 3.1* (IDT, <http://www.idtdna.com>) pelo qual foram

analisadas as T_m e parâmetros como estabilidade de estruturas secundárias resultantes de autoanelamento, homo- e heterodimerização. A sequência CG foi adicionada na extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse* para permitir a melhor estabilidade de clivagem dos produtos de PCR pelas enzimas de restrição (Tabela 4). As sequências codificadoras foram analisadas no programa *SnapGene* a fim da comprovação da inexistência de sítios internos reconhecidos pelas enzimas de restrição. Foram simulados clones de pGEX-4T-1-D01698, pGEX-4T-1-D00607 e pGEX-4T-1-K00405 pelo programa *SnapGene* nos quais foram verificadas as corretas fases de leitura dos genes *Dof* com a *tag* de GST e com o sítio de clivagem por trombina.

Os *primers* foram sintetizados pela IDT, representada no Brasil pela empresa Síntese Biotecnologia Ltda. (<http://www.sintesebiotecnologia.com.br/>).

Tabela 4. Sequência e temperatura média de desnaturação (T_m) dos *primers* projetados para a clonagem molecular de genes *Dof* no vetor pGEX-4T-1. Em vermelho estão indicados os sítios de reconhecimento da enzima de restrição BamHI e, em azul, os sítios da enzima EcoRI. As sequências adicionais para estabilidade das clivagens pelas endonucleases estão sublinhadas.

<i>Primer</i>	Sequência (‘5-3’)	T_m (°C)
D01698-For	<u>CG</u> GGATCC ATG GAC ACC GCT CAG TGG	57,5
D01698-Rev	<u>CG</u> GAATTC TTA CCA CGA TCC GCC ACC	57,5
D00607-For	<u>CG</u> GGATCC ATG GAG CAA GAG AGC AAG CCA	59,1
D00607-Rev	<u>CG</u> GAATTC TTA TGG AGG AGG GCC AAA TCC TG	58,8
K00405-For	<u>CG</u> GGATCC ATG GAC AAC GCA GCC CC	58,7
K00405-Rev	<u>CG</u> GAATTC TCA CCA TGA TCC TCC AGT GCC	59,2

4.9.2 Amplificação dos três genes *Dof* a partir de pENTR/D-TOP para as etapas de clonagem no vetor de expressão pGEX-4T-1

Para a amplificação das CDS e a inserção dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição BamHI e EcoRI (Tabela 4), PCRs foram realizadas para um volume final de 50 μ L contendo 5 μ L de tampão *Pfu Buffer* 10 X com MgSO₄; 2 μ L de dNTPs (5 mM); 2 μ L de *primers forward* gene-específico (10 μ M); 2 μ L de *primers reverse* gene-específico (10 μ M), 1 μ L de *Pfu DNA Polymerase* (3 U/ μ L; Promega); 1 μ L (10 ng/ μ L) das minipreparações plasmidiais dos vetores pENTR/D-TOPO ligados aos genes *Dof* e 37 μ L de água MiliQ autoclavada. A amplificação foi realizada em termociclador LGC XP *Cycler* (*Bioer Technology*) conforme programa descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Programa de termociclagem para a amplificação dos genes *Dof* para as etapas de clonagem em pGEX-4T-1.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Desnaturação Inicial	95	2	1
Desnaturação	95	1	30
Anelamento	52	0,5	30
Síntese	72	2	30
Síntese Final	72	5	1

Os produtos das PCRs foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com brometo de etídeo a 0,01 mg/L. Os fragmentos de tamanhos esperados foram removidos do gel e purificados utilizando-se o DNA *Purification Kit* (Ludwig Biotech), conforme as recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

4.9.3 Digestão dos *amplicons Dof* e do vetor de expressão pGEX-4T-1

Os *amplicons* purificados de cada um dos três genes *Dof* (D00607, D01698, K00405) e o vetor pGEX-4T-1 foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. Para cada gene e vetor, separadamente, a reação de clivagem foi realizada em um volume final de 30 μL contendo 3 μL de tampão E 10 X (Promega); 0,2 μL de BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; Promega); 1,2 μL da enzima EcoRI (12 U/mL; Promega) e 1,5 μL da enzima BamHI (10 U/mL; Promega); 15 μL dos *amplicons* de cada gene (200 ng/ μL) e 13,5 μL de pGEX-4T-1 (220,7 ng/ μL) em 9,1 μL e 10,6 μL de água MiliQ autoclavada, respectivamente. As amostras foram digeridas por 4 h à 37 °C.

Todo o conteúdo das digestões foi aplicado em gel de agarose a 0,8% contendo EtBr a 0,01mg/L e submetido à eletroforese a 60 V por 2,5 h. Após, foi realizada a purificação das amostras digeridas e do plasmídeo linearizado, sendo as bandas removidas do gel e purificadas utilizando-se o DNA *Purification Kit* (Ludwig Biotech). As amostras foram quantificadas no NanoDrop 2000c.

Devido à baixa concentração obtida do plasmídeo pGEX-4T-1 digerido, foi realizada a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, nova precipitação com etanol e acetato de sódio e ressuspensão em 50 μL de TE. Verificou-se a qualidade e a quantidade das preparações do vetor por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e realizou-se nova purificação e quantificação por NanoDrop 2000.

4.9.4 Ligação dos insertos em pGEX-4T-1 e seleção de clones positivos

A ligação entre cada gene *Dof* ao plasmídeo pGEX-4T-1 digerido foi realizada utilizando-se a enzima T4 DNA *Ligase* (Fermentas). A reação foi realizada contendo 2 μL de tampão T4 *ligase* 10 X; 1 U de T4 DNA *Ligase*; 0,8 μL do plasmídeo pGEX-4T-1 digerido (130 ng/ μL); 1,9 μL dos *amplicons* digeridos (50,0 ng/ μL) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 20 μL . As amostras foram incubadas por 1 h à 22 °C. As quantidades utilizadas de *amplicon* e de vetor, para as reações, foram calculadas para totalizar proporção molar de 5:1, respectivamente.

Utilizou-se 10 µL da reação de ligação para a transformação, via choque-térmico, de células termocompetentes de *E. coli OmniMax 2*, seguindo protocolo descrito em AUSUBEL *et al.* (2002). Após a transformação, 200 µL e o concentrado de células das suspensões bacterianas foram plaqueadas com alça de Drigalski em placas de Petri com meio de cultura LB sólido contendo 100 mg/L de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C *o/n* até a observação de colônias.

Após a obtenção de colônias pelas transformações, PCRs de colônia foram realizadas para verificar possíveis clones positivos contendo os genes *Dof* clonados. As reações foram preparadas contendo 10 µL de tampão *Colorless GoTaq Flexi Buffer 5 X*; 3 µL de MgCl₂ (25 mM); 2 µL de dNTPs (5 mM); 2 µL de *primers forward* gene-específico (10 µM); 2 µL de *primers reverse* gene-específico (10 µM); 0,5 µL de *GoTaq Hot Start DNA Polymerase* (5 U/µL; Promega) e água MiliQ autoclavada para um volume final de 50 µL. As reações foram realizadas no termociclador LGC XP *Cycler (Bioer Technology)* e o programa utilizado está representado na Tabela 5. Volume de 5 µL dos *amplicons* foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 µg/mL por 1,5 h a 70 V.

As colônias positivas foram inoculadas em meio LB para a realização da purificação das minipreparações plasmidiais utilizando-se o *Plasmid Mini Purification Kit* (Ludwig Biotech) e quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

A confirmação da integridade dos genes clonados foi realizada por sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando-se o programa *SnapGene*.

4.9.5 Transformação de linhagens de expressão bacteriana e seleção de clones positivos

As linhagens bacterianas de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL* e BL21 (DE3) pT-GroE (Tabela 6) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Itabajara S. Vaz Junior (Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS) e armazenadas a -80 °C. As mesmas foram preparadas para termocompetência e transformadas via choque-térmico com 4 µL das construções pGEX-4T-1-D01698, pGEX-4T-1-D00607 e vetor vazio pGEX-4T-1 (controle), seguindo protocolo conforme descrito em AUSUBEL *et al.* (2002). A linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Star promove a alta estabilidade do mRNA e, assim, um mais alto rendimento da produção proteica. A linhagem BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL* contém cópias extras dos genes de tRNAs que ligam os códons raros de arginina, isoleucina e leucina. A linhagem BL21 (DE3) pT-GroE possui o plasmídeo pT-GroE com genes para as chaperonas GroES e GroEL, permitindo o correto dobramento (*folding*) das proteínas e sua solubilidade (GOPAL & KUMAR, 2013; ROSANO *et al.*, 2014).

Tabela 6. Linhagens de *E. coli* escolhidas para os ensaios de expressão dos genes *Dof* de *E. grandis*. Estão indicadas as características genotípicas de cada linhagem selecionada: F⁻, não carrega o plasmídeo F (fator de fertilidade ou fator sexual); *ompT*, mutação na protease da membrana externa; *gal*, mutação para o metabolismo da galactose; *dcm*, metilação de citocina bloqueada; *hsdS_B* (*rB*⁻, *mB*⁻), permite a clonagem de DNA sem clivagem por endonucleases de restrição endógenas; λ(DE3), profago λ portador do gene da T7 RNA polimerase e do *lacI*^q; *lon*, a cepa é mutante para a protease do lon; *rne131*, mutação no gene da RNase E ; *Cam*^r, gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol; *Tet*^r, gene que confere resistência ao antibiótico tetraciclina; linhagem que contém cópias extras dos genes de tRNAs *argU ileY leuW*; *PT7-groESL*, codifica as chaperonas GroES e GroEL.

Linhagem	Genótipo
BL21 (DE3) Star	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>rB</i> ⁻ , <i>mB</i> ⁻) <i>gal dcm rne131</i> λ(DE3)
BL21 (DE3) <i>CodonPlus-RIL</i>	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (<i>rB</i> ⁻ , <i>mB</i> ⁻) <i>gal dcm lon Tet</i> ^r λ(DE3) + [<i>argU ileY leuW Cam</i> ^r]

BL21 (DE3) pT-GroE

$F^- ompT hsdS_B (r_B^-, m_B^-) gal dcm lon \lambda(DE3)$
+ *PT7-groESL Cam^r*

Após cada transformação, PCRs de colônia foram realizadas para verificar possíveis clones positivos, conforme reação descrita no item 4.9.4. Dos produtos das PCRs, 5 μ L foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % corado com EtBr a 0,01 μ g/mL, submetido à eletroforese por 1,5 h a 70 V.

4.9.6 Ensaios de indução da expressão gênica e análise da expressão por SDS-PAGE

Para os ensaios de indução das proteínas recombinantes por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), três clones positivos de cada uma das linhagens transformadas de *E. coli*::pGEX-4T-1-*Dof* foram selecionadas. Foram realizados pré-inóculos dos clones em 10 mL de meio 2XYT (16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada, pH 7) com o antibiótico ampicilina a 100 mg/L acrescido do antibiótico de seleção para cada linhagem bacteriana. As concentrações de antibióticos utilizadas para a seleção de cada linhagem bacteriana foram 10 mg/L de tetraciclina e 34 mg/L de cloranfenicol para a seleção da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL*; e 34 mg/L de cloranfenicol para a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE. As bactérias foram mantidas *o/n* à 37 °C com agitação de 200 rpm. No dia seguinte, 300 μ L dos pré-inóculos foram adicionados em 15 mL de meio 2XYT com ampicilina e o antibiótico seletivo de cada linhagem bacteriana. As bactérias foram multiplicadas à 37 °C, 200 rpm até atingir a OD de ~0,7 e a estas adicionou-se 1 mM de IPTG. O processo de indução foi realizado em duas condições diferentes, durante 3 h à 37 °C e, também, durante 20 h à 20 °C. Após cada indução, as suspensões bacterianas foram centrifugadas durante 20 min à 14.000 x g. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* mantidos à -20 °C.

Para confirmar a presença de proteínas recombinantes como consequência da expressão dos genes de interesse, os *pellets* foram lisados em 300 μ L de tampão de lise (Tris-

HCl a 50 mM, pH 7,8) e 3 μ L de lisozima a 20 mg/mL por 20 min à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 1 μ L de DNase I (1 U/ μ L; Invitrogen), e 30 μ L de MgCl₂ 1 M. As amostras foram ultrassonicadas pelo sonicador de banho *Ultracleaner 800* (Unique) durante 10 min. Os extratos brutos foram aliquotados em 30 μ L. O restante do lisado foi centrifugado durante 10 min a 14.000 x g, separando-se o sobrenadante do *pellet* formado. Nas amostras foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4 %; glicerol 40 %; β -mercaptoetanol 0,1 M e azul de bromofenol 0,002 %) e os *pellets* (fração insolúvel) foram ressuspensos em 250 μ L de Tris-HCl a 10 mM antes da adição do tampão de amostra. Todas as amostras foram fervidas à 100 °C por 5 min.

As análises para detecção das proteínas recombinantes foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando-se gel de empacotamento a 5 % e gel de corrida a 12 %, em uma cuba de eletroforese vertical (Bio-Rad) sob 100 V durante 2,5 h. Um volume de 15 μ L de cada amostra desnaturada das frações solúvel e insolúvel foram aplicadas nos géis e estes foram posteriormente corados em *Coomassie Brilliant Blue R-250* por no mínimo 2 h.

4.9.7 Ensaios de *dot blot* e *western blot*

A quantidade adequada do anticorpo primário anti-GST utilizado na técnica de *western blot* foi testada por diferentes diluições pela técnica de *dot blot*. Para isso, quadrados (1 cm²) da membrana de PVDF (Millipore) foram colocados individualmente em poços de placas de cultura. Logo, aplicou-se 15 μ L das amostras proteicas derivadas dos clones bacterianos positivos quanto à expressão dos genes *Dof*, previamente confirmadas por SDS-PAGE, além do controle positivo para GST. Após sua aplicação na membrana, as amostras permaneceram em repouso em temperatura ambiente por 15 min para a completa secagem. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com 5 % de leite desnatado em tampão TBS 1 X (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 e NaCl 0,15 M) por um período de 2 h sob agitação. O anticorpo primário anti-GST monoclonal produzido em camundongos (e gentilmente cedido pelo grupo do professor Dr. Henrique B. Ferreira, CBiot/UFRGS) nas diluições de 1:250, 1:500, 1:1.000 e 1:2.000 foram testados. As membranas foram incubadas com as diferentes diluições de anticorpo primário

em 1,5 % de leite desnatado em tampão TTBS 1X (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4; NaCl 0,15 M; e Tween 20 0,05%) por no mínimo 2 h, em agitação. As membranas foram lavadas com a solução de TTBS 1 X e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma) em diluição de 1:5.000 durante 2 h. As membranas foram novamente lavadas em tampão de lavagem e reveladas. A revelação colorimétrica foi realizada utilizando os substratos BCIP a 0,015 % e NBT a 0,03 % em tampão de revelação (Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0; NaCl 0,1 M; e MgCl₂ 2,5 mM).

Para confirmar a presença das proteínas de interesse, utilizou-se a técnica de *western blot*. Depois de serem resolvidas por SDS-PAGE, as amostras proteicas foram transferidas por gravidade para uma membrana de PVDF em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e metanol 20%). Após a transferência de no mínimo 16 h, a membrana foi bloqueada com 5 % de leite desnatado em tampão TBS 1X. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-GST em diluição de 1:500, diluição previamente estabelecida por *dot blot*, em 1,5 % de leite desnatado em tampão TTBS 1 X durante 2 h. Após lavagens com o tampão TTBS 1 X, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a fosfatase alcalina (Sigma) em diluição de 1:5.000 durante 2 h. A revelação colorimétrica foi realizada utilizando os substratos BCIP 0,015% e NBT 0,03% em tampão de revelação (Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0; NaCl 0,1 M; e MgCl₂ 2,5 mM).

4.9.8 Expressão em maior escala e purificação das proteínas recombinantes

Otimizadas as condições de expressão e confirmada a presença das proteínas recombinantes por *western blot*, realizou-se a produção de proteínas em maior escala. Conforme descrito no item 4.9.6, realizou-se a indução dos clones bacterianos nas melhores condições de expressão para a produção das proteínas na fração solúvel. Para isso, um clone positivo de cada proteína Dof foi selecionado e inoculado em um volume de 500 mL de meio 2XYT acrescido de glicose a 1%. As células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e os *pellets* foram ressuspensos em 30 mL de PBS 1 X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,3). As suspensões de células foram lisadas utilizando-se

sonicador ultrassônico (Unique) com ciclos de 10 pulsos de 1 min cada com intervalos de 30 s, em gelo.

O lisado final de células foi centrifugado a 14.000 x g por 40 min e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm, sendo posteriormente submetido à cromatografia de afinidade na resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare). A coluna contendo 2 mL de resina foi previamente equilibrada com 40 mL de PBS 1X e a purificação foi realizada conforme as instruções do fabricante. As amostras do sobrenadante foram circuladas pela coluna 3 vezes. As proteínas não retidas foram eluídas com 10 mL de PBS 1 X. As proteínas de fusão retidas (GST-fusionadas) foram eluídas da coluna em tampão de eluição contendo glutathione reduzida (Tris-HCl 50 mM e glutathione reduzida 10 mM, pH 8,0). As amostras purificadas foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot*.

5. Resultados e Discussão

5.1 Seleção dos genes *Dof* de *E. grandis* potencialmente críticos à genese da madeira

Os fatores de transcrição *Dof* de *E. grandis* constituem uma família de 26 genes descritos a partir de estudos filogenéticos (D'ALMEIDA, 2014). Deste grupo gênico, os genes Eucgr.D00607, Eucgr.D01698 e Eucgr.K00405 foram escolhidos como ótimos candidatos para o estudo funcional dos fatores de transcrição *Dof* relacionados com a biogênese de tecidos vasculares em *E. grandis*. O perfil de expressão transcricional mais elevado e preferencial em tecidos vasculares de caules destes genes em relação a folhas e raízes de plântulas de *E. grandis* foi o primeiro fator de escolha, de acordo com ensaios de RT-qPCR realizados previamente pelo nosso grupo (D'ALMEIDA, 2014). Além disso, os genes *Dof* D00607 e D01698 apresentaram resposta positiva a tratamentos com o regulador de crescimento citocinina (D'ALMEIDA, 2014). Considerando o desenvolvimento vascular, a sinalização de citocinina é necessária para a identidade pluripotente das células procambiais durante a fase primária do desenvolvimento da raiz de *A. thaliana*. Além disso, as citocininas parecem ser necessárias para a proliferação de células vasculares durante o desenvolvimento vascular primário tanto na raiz quanto no ápice (MAHONEN *et al.*, 2000; MAHONEN *et al.*, 2006). Outros trabalhos comprovam a importância da citocinina no desenvolvimento vascular. Assim, NIEMINEN *et al.* (2008) descreveram a sinalização de citocininas durante o desenvolvimento cambial em troncos de duas espécies de arbóreas, álamo (*Populus trichocarpa*) e vidoeiro de prata (*Betula pendula*). De acordo com seus resultados, as citocininas são os principais reguladores hormonais necessários para o desenvolvimento cambial. Durante o desenvolvimento secundário, sua principal função é a regulação da proliferação celular. O câmbio vascular é um tecido meristemático que origina os vasos do xilema e do floema secundário nas plantas com o crescimento secundário, como árvores lenhosas, no qual aumenta o caule e a raiz em diâmetro (SPICER & GROOVER, 2010).

A partir de resultados anteriormente obtidos pelo grupo com a caracterização filogenética dos genes *Dof* de *E. grandis* (D'ALMEIDA, 2014), buscou-se identificar genes com mais alta

homologia a genes *Dof* anteriormente caracterizados por outros autores e comprometidos com a gênese de tecidos vasculares. De acordo com essas análises, o gene *Dof* D01698 apresenta homologia aos genes *Dof* At1g64620 (*Dof* 1.8) e At4g24060 (*Dof* 4.6) de *A. thaliana*. O gene *Dof* 4.6 é expresso em sistemas vasculares de raízes e no estágio pré-procambial da formação vascular de folhas (GARDINER *et al.*, 2010). Já o gene *Dof* D00607, apresenta homologia ao gene *Dof* At438000 (*Dof* 4.7). Estudos de transcrito de células provasculares/procambiais microdissecadas permitiram identificar que o gene *Dof* 1.8 e o gene *Dof* 4.7 são potencialmente expressos em tecidos vasculares em diferentes estádios do desenvolvimento (GANDOTRA *et al.*, 2013). O gene *Dof* K00405 apresenta homologia aos genes *Dof* At4g00940 (*Dof* 4.1), DAG2 (*Dof* 2.5) e DAG1 (*Dof* 3.7). O gene *Dof* 4.1 não apresenta função determinada, porém estudos comprovaram que a proteína por ele codificada é capaz de se mover entre as raízes e a endoderme em uma via seletiva de plasmodesmata. O movimento requer um motivo de tráfego intercelular (ITM, do inglês, *intercellular trafficking motif*) que compreende o motivo dedo-de-zinco e o NLS (CHEN *et al.*, 2013). Como relatado na literatura, DAG2 (do inglês, *Dof Affecting Germination*) e DAG1 apresentam um perfil de expressão muito semelhante, restritos ao tecido vascular. Durante o desenvolvimento embrionário, o gene DAG1 é expresso no estágio globular tardio. Em contraste com DAG1, embora também DAG2 seja expresso durante o desenvolvimento embrionário, a ausência dele não produz fenótipos embrionários óbvios. A expressão de DAG2 é positivamente regulada por fatores ambientais que desencadeiam a germinação, enquanto sua expressão é reprimida por DAG1 que regula diretamente DAG2 (SANTOPOLO *et al.*, 2015).

Em conclusão, é provável que quase todos os membros da família *Dof* de *A. thaliana* sejam expressos no sistema vascular, sendo até agora uma das famílias de fatores de transcrição que exibem uma forte especificidade de localização e expressão nestes tecidos vegetais (LE HIR & BELLINI, 2013).

5.2 Extração de ácidos nucleicos e síntese de cDNA correspondente aos transcritos *Dof*

Foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais de tecido vascular de caule de *E. grandis* a partir de material mantido a -20 °C (D'ALMEIDA 2014), utilizando-se o protocolo

modificado de DOYLE & DOYLE (1987). Após a extração, a qualidade das amostras foi analisada em gel de agarose a 0,8 % e quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Pode-se observar DNA genômico e rRNAs íntegros, resultantes da eficácia do método de extração empregado (Figura 7). Uma alíquota de ácidos nucleicos extraídos foi submetida ao tratamento com DNase I visando a degradação de DNA genômico presente na amostra. A qualidade do RNA após tratamento foi avaliado, como anteriormente, podendo-se observar a completa hidrólise do DNA genômico e a redução parcial de RNA total da amostra tratada (Figura 7).

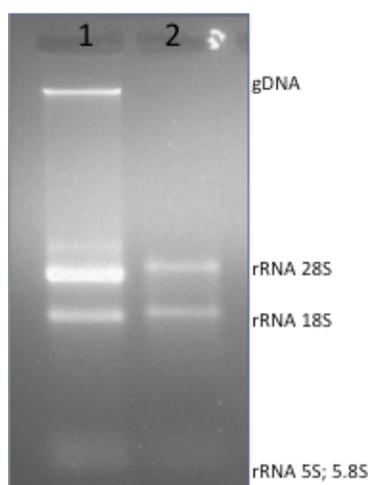


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % de ácidos nucleicos extraídos de tecido vascular de *E. grandis*. Amostras de ácidos nucleicos totais (1) e após tratamento com DNase I (2). Em 1, é possível observar a presença de DNA genômico bem como dos RNAs ribossomais 28 S, 18 S e 5 S/5.8 S. Em 2, a enzima DNase I hidrolisou completamente o DNA genômico da amostra, reduzindo apenas parcialmente a quantidade de rRNA observada.

Posteriormente, a síntese de cDNAs foi realizada utilizando-se a amostra de RNA total tratada com DNase I e *primers reverse* específicos aos genes D01698, D00607 e K00405 em reação catalisada pela enzima *M-MuLV-RT* (Biolabs). PCRs utilizando-se *primers* gene-específicos (Tabela 1) foram realizadas para a comprovação da síntese de cDNAs conforme descrito no item 4.4. Nas primeiras tentativas, não foi possível obter-se qualquer produto amplificado a partir das sínteses de cDNAs realizadas. Segundo a literatura, uma possível

justificativa para o não sucesso na síntese de cDNA é a qualidade e a quantidade de mRNAs presentes na amostra após o tratamento com a enzima DNase I. Como a DNase I foi inativada por aquecimento para o término da reação, os cátions divalentes presentes no tampão de digestão da DNase I (Mg^{2+} e Ca^{2+}) podem ter ocasionado quebras na fita de RNA quando aquecidos. Tipicamente, o RNA é degradado quando aquecido à 80 °C por 5 min na presença dos cátions divalentes $MgCl_2$ e $CaCl_2$ (MALEK *et al.*, 2000).

Desse modo, novas tentativas de síntese de cDNAs foram realizadas utilizando-se como molde as amostras de RNA total tratada e não tratada com DNase I e *primers* universais oligo(dT). Para a análise da síntese de cDNA, PCRs foram executadas a partir de ambas as amostras utilizando-se *primers* gene-específicos (Tabela 1). Assim, foi possível observar, de acordo com a Figura 8, que apenas as PCRs utilizando as amostras de RNA total não-tratadas com DNase I possibilitaram a obtenção de fragmentos de tamanhos esperados para os genes D01698 (915 pb), K00405 (915 pb) e D00607 (885 pb). Como o DNA genômico não foi removido das amostras para a síntese de cDNA, foi possível detectar-se também bandas de ~1,5 kb dos genes D01698 e K00405, os quais possuem íntrons conforme suas sequências genômicas (D'ALMEIDA 2014). O gene D00607 não possui íntrons e, assim, apenas uma banda foi observada na imagem (Figura 8).

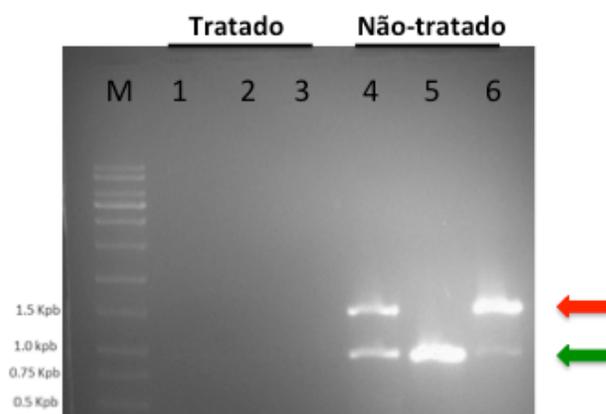


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos da RT-PCR utilizando-se *primer* oligo(dT) para a síntese de cDNA. As PCRs realizadas a partir das amostras tratadas com DNase I não resultaram em qualquer fragmento de amplificação (1-3). Os fragmentos das amostras 4-6 (seta vermelha) representam os produtos da amplificação dos genes D01698 e K00405, respectivamente, a partir de DNA genômico. Os

fragmentos das amostras 4, 5 e 6 (seta verde) representam as bandas de tamanho esperado para síntese de cDNA a partir de mRNA sem tratamento com DNase I. Canaletas: M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); amostras tratadas com DNase I: 1-D01698; 2-D00607 e 3-K00405; amostras não tratadas com DNase I: 4-D01698; 5-D00607 e 6-K00405.

Adicionalmente, PCRs foram realizadas com a enzima *Pfu DNA Polymerase* (Promega) a partir de amostra não-tratada de RNA total de caules de *E. grandis* com DNase I, conforme descrito no item 4.4. A utilização da enzima *pfu DNA Polymerase* é ideal para uma variedade de aplicações que requerem a síntese de DNA de alta fidelidade, como a clonagem gênica, pois apresenta a mais alta fidelidade de síntese em relação a *Taq DNA Polymerase* (MCINERNEY *et al.*, 2014). Os produtos das PCRs foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e os fragmentos dos genes D01698 (915 bp) e D00607 (885 pb) foram excisados do gel para posterior purificação pelo *DNA Purification Kit* (Ludwig Biotech; Figura 9). Outras tentativas de amplificação do cDNA correspondente ao gene K00405 com o emprego da enzima *Pfu DNA Polymerase* foram realizadas, mas não obtiveram sucesso na amplificação. Assim, o *amplicon* do gene K00405 (915 pb) foi obtido pela PCR com a enzima *Taq DNA* polimerase (Figura 8) e purificado. As amostras purificadas foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

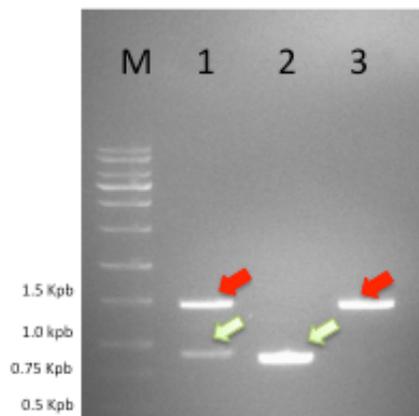


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos dos genes *Dof* amplificados pela enzima *Pfu DNA Polymerase* a partir de amostra de RNA total de caule de *E. grandis* não tratada com DNase I. As setas verdes indicam os fragmentos de tamanhos esperados para a síntese de cDNA dos genes D01698 (1) e D00607 (2). Não foi possível detectar a banda de cDNA do gene K00405 (3). As setas em vermelho indicam a amplificação dos genes *Dof* a partir de DNA genômico. Canaletas: M, marcador de tamanhos de fragmentos de

DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1, *amplicons* do gene D01698; 2, *amplicons* do gene D00607 e 3, *amplicons* do gene K00405.

5.3 Clonagem dos amplicons *Dof* em pENTR/D-TOPO e confirmação de clones positivos

As regiões codificantes dos genes *Dof* D01698, D00607 e K00405, previamente amplificadas, foram inseridas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) conforme descrito no item 4.5. As transformações de células de *E. coli One Shot[®] Mach1[™] TI* (Invitrogen) com os produtos das reações de ligação resultaram na seleção de 2 colônias para pENTR-D/TOPO-D00607, 1 colônia para pENTR/D-TOPO-K00405 e 19 colônias para pENTR/D-TOPO-D01698. As colônias foram inoculadas para a minipreparação de plasmídeos pelo método de lise alcalina, para posterior confirmação das clonagens por reações de hidrólise com a enzima *NcoI* (NE Biolabs). Como indicado na Figura 10, a digestão com *NcoI* (NE Biolabs) resultou em fragmentos de tamanhos esperados de ~2,9 kb e 561 pb para o vetor pENTR/D-TOPO-D01698 e de 3,5 kb para os vetores pENTR/D-TOPO-D00607 e pENTR/D-TOPO-K00405. Portanto, foi confirmado o êxito das reações de clonagem dos amplicons *Dof* derivados de *E. grandis* no vetor de entrada pENTR/D-TOPO. Os clones positivos foram purificados para posteriores etapas de recombinação.

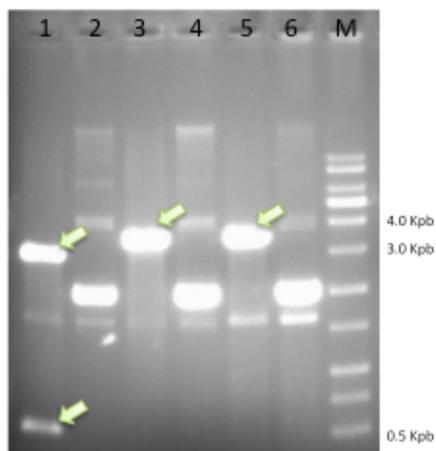


Figura 10. Reações de clivagem com a enzima de restrição *NcoI* das minipreparações plasmidiais de pENTR/D-TOPO ligado aos *amplicons* dos genes *Dof*. Os fragmentos indicados pelas setas verdes (amostras 1,

3 e 5) estão de acordo com os tamanhos esperados. Canaletas: 1, pENTR/D-TOPO-D01698 clivado; 2, pENTR/D-TOPO-D01698 não-clivado; 3, pENTR/D-TOPO-D00607 clivado; 4, pENTR/D-TOPO-D00607 não-clivado; 5, pENTR/D-TOPO-K00405 clivado; 6, pENTR/D-TOPO-K00405 não-clivado; M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Ludwig Biotech).

A confirmação da integridade dos genes clonados foi realizada por sequenciamento de DNA utilizando-se os *primers forward e reverse* gene-específicos, além dos *primers* universais M13 (-21) *forward e M13 reverse*. Os resultados permitiram concluir que, de fato, os genes *Dof* foram clonados no vetor pENTR/D-TOPO. O resultado do sequenciamento do plasmídeo pENTR/D-TOPO-D01698 confirmou o inserto da região codificadora do gene D01698 no plasmídeo pENTR/D-TOPO. Entretanto, foi possível detectar, pela sobreposição de vários sequenciamentos, a troca de bases de A para G na posição 64 (Figura 11). A troca de bases resultou na troca do aminoácido treonina para alanina da sequência proteica. Possivelmente, a troca de nucleotídeos possa ser intrínseca da sequência gênica presente na cultivar de *E. grandis* utilizada na etapa de extração dos ácidos nucleicos. De fato, para a amplificação dos genes *Dof*, foi utilizada a enzima de alta fidelidade *Pfu DNA Polymerase*, que apresenta como característica a menor taxa de erros de síntese entre as polimerases termoestáveis (MCINERNEY *et al.*, 2014). A identificação de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) estão presentes entre diferentes cultivares de plantas da mesma espécie como, por exemplo, em videira (*Vitis vinifera*; MERCENARO *et al.*, 2017), arroz (*Oriza sativa*; MCNALLY *et al.*, 2006), soja (*Glycine max*; VIDAL *et al.*, 2012) e outras tantas espécies.

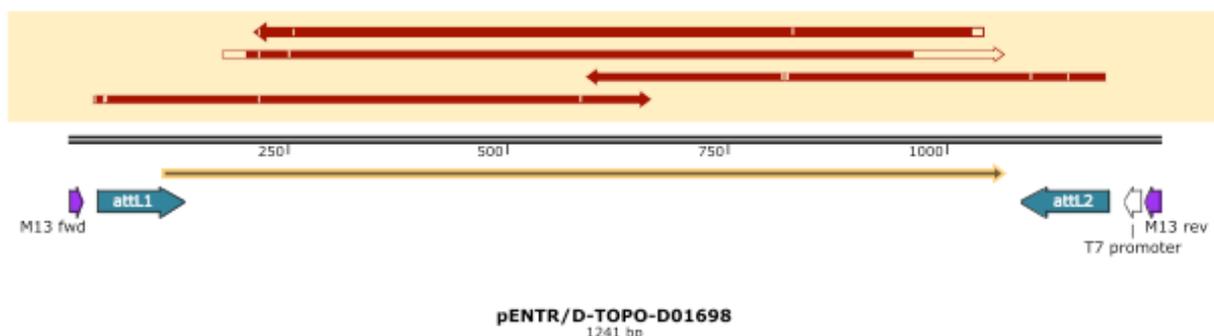


Figura 11. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-D01698. Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências nucleotídicas originais de pENTR/D-TOPO e da CDS do gene D01698. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pENTR/D-TOPO-D01698 cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido das setas indica o *primer* (*forward* ou *reverse*) utilizado para os sequenciamentos. Os traços brancos no interior das setas vermelhas superiores indicam *mismatches* identificados no alinhamento. A seta amarela indica a sequência da CDS do gene D01698.

O resultado do sequenciamento do plasmídeo pENTR/D-TOPO-D00607 confirmou a clonagem da região codificadora do gene D00607 no vetor pENTR/D-TOPO na orientação senso e sem qualquer alteração de nucleotídeos, conforme ilustrado na Figura 12.

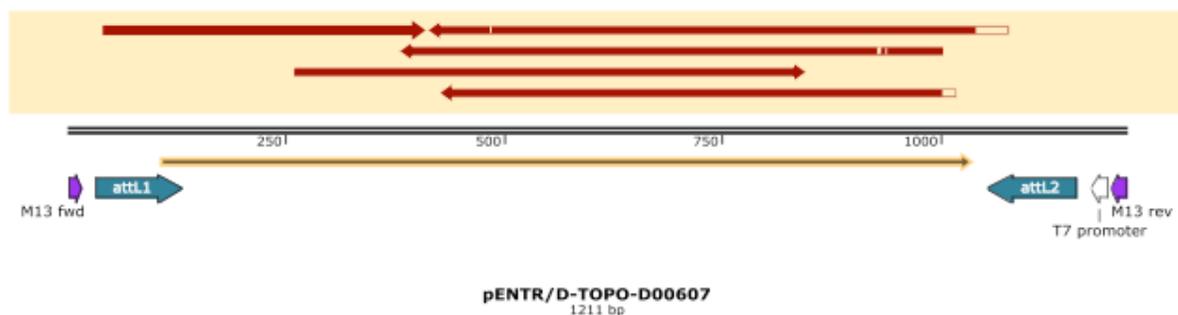


Figura 12. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-D00607. Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências nucleotídicas originais de pENTR/D-TOPO e da CDS do gene D00607. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pENTR/D-TOPO-D00607 cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido das setas indica o *primer* (*forward* ou *reverse*) utilizado para os sequenciamentos. Os traços brancos no interior das setas vermelhas superiores indicam *mismatches* identificados no alinhamento. A seta amarela indica a sequência da CDS do gene D00607.

O resultado do sequenciamento do plasmídeo pENTR/D-TOPO-K00405 confirmou o inserto da região codificadora do gene K00405 no plasmídeo de entrada. Entretanto, foi possível observar alguns *mismatches* pelo sequenciamento. Podemos analisar uma série de troca de nucleotídeos em todos os resultados de sequenciamento que se sobrepõem, porém, nenhum deles acarretou em troca do aminoácido da sequência proteica correspondente. As substituições detectadas foram: G para A na posição 147, mantendo o aminoácido treonina; C para A na posição 183, mantendo o aminoácido prolina; C para T na posição 300, mantendo o

aminoácido asparagina; T para G na posição 435, mantendo o aminoácido histidina; e T para C na posição 789, mantendo o aminoácido ácido aspártico (Figura 13). As trocas de nucleotídeos observadas na sequência gênica possivelmente sejam provenientes do uso da enzima *Taq* DNA polimerase nas PCRs. Esse gene foi o único a não apresentar *amplicons* a partir da amplificação com a *Pfu* DNA Polymerase, assim, utilizou-se o produto amplificado pela enzima *Taq* DNA polimerase. Como essa enzima não apresenta atividade exonucleásica de revisão 3'-5', a *Taq* sintetiza o DNA com maior rapidez, porém, com uma maior taxa de erros (POTAPOV & ONG, 2017).

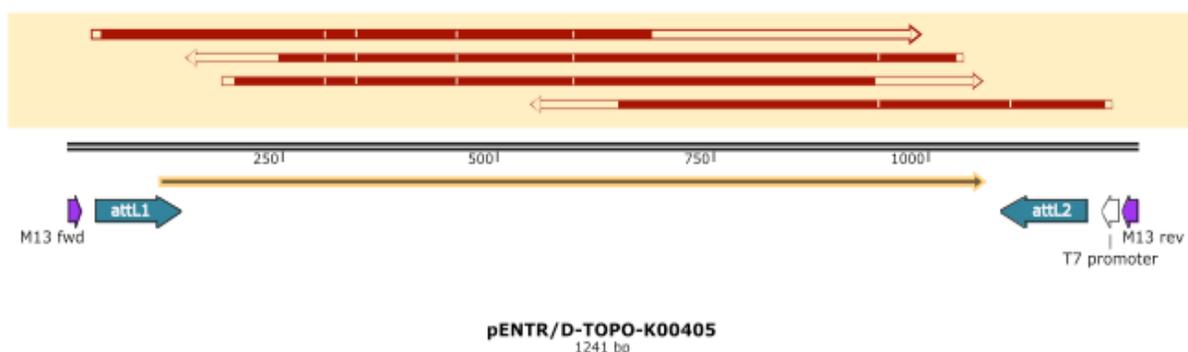


Figura 13. Mapa de cobertura do sequenciamento de pENTR/D-TOPO-K00405. Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências nucleotídicas originais de pENTR/D-TOPO e da CDS do gene K00405. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pENTR/D-TOPO-K00405 cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido das setas indica o *primer* (*forward* ou *reverse*) utilizado para os sequenciamentos. Os traços brancos no interior das setas vermelhas superiores indicam *mismatches* identificados no alinhamento. A seta amarela indica a sequência da CDS do gene K00405.

5.4 Ensaios de expressão dos genes *Dof* de *E. grandis* em *A. thaliana*

5.4.1 Recombinação dos genes *Dof* clonados em pENTR/D-TOPO ao vetor binário pH7WG2D

As reações de recombinação entre os vetores de entrada pENTR/D-TOPO-D01698, pENTR/D-TOPO-D00607 e pENTR/D-TOPO-K00405 com o vetor binário pH7WG2D (VIB)

foram realizadas utilizando-se a estratégia Gateway (Invitrogen), como descrito no item 4.7.1. A confirmação dos clones positivos foi realizada por reações de digestão com a enzima BamHI (Promega) a partir das minipreparações plasmidiais de quatro colônias selecionadas, resultantes da transformação de *E. coli* OmniMAX 2 termocompetentes com os produtos das reações de recombinação. As reações de clivagem resultaram nos fragmentos de tamanhos compatíveis com o esperado de 8,7 kb, 2,7 kb e 979 pb, como observados na Figura 14. Apenas um clone (4) da recombinação de pH7WG2D-D01698 não apresentou o fragmento de 8,7 kb. Já, para a amostra 9 do clone pH7WG2D-K00405, não foi possível observar os fragmentos de 8,7 kb e 2,7 kb. Assim, foi possível obter-se três clones positivos da versão pH7WG2D-D01698, quatro clones positivos da versão pH7WG2D-D00607 e três clones positivos para pH7WG2D-K00405.

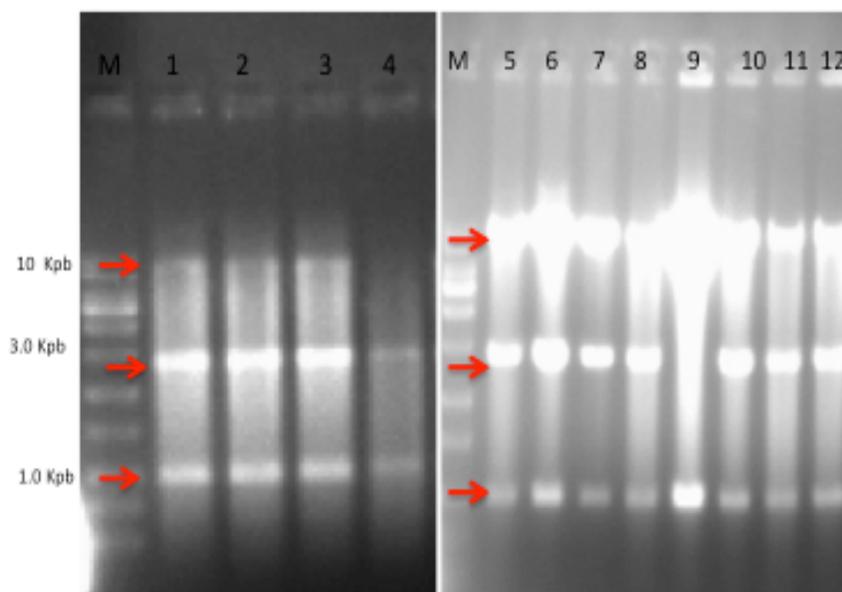


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos da recombinação dos genes *Dof* entre o vetor de entrada pENTR/D-TOPO e o vetor binário pH7WG2D, clivados com a enzima BamHI. As bandas indicadas pelas setas vermelhas apresentam o tamanho dos fragmentos gerados pela digestão dos vetores pH7WG2D recombinantes contendo os genes *Dof*. Foram testados quatro clones para cada uma das recombinações. Amostras 1-4 correspondem ao vetor pH7WG2D-D01698; amostras 5-8 ao vetor pH7WG2D-D00607 e amostras 9-12 ao vetor pH7WG2D-K00405. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Ludwig Biotech).

5.4.2 Transformação genética de *A. tumefaciens* com pH7WG2D-*Dof*

Células termocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foram transformadas via choque-térmico com as versões dos genes *Dof* recombinados no vetor binário pH7WG2D. Grande número de colônias foi obtido como resultado da transformação dos três conjuntos de plasmídeos em *A. tumefaciens*. Dessas, seis colônias foram escolhidas para confirmação da transformação genética por meio de PCRs de colônia utilizando-se *primers* gene-específicos. As seis colônias apresentaram os *amplicons* esperados para a amplificação dos genes *Dof*. Na Figura 15, é possível observar fragmentos de ~1.0 kb correspondentes ao esperado para os genes D01698 (915 pb), D00607 (885 pb) e K00405 (915 pb).

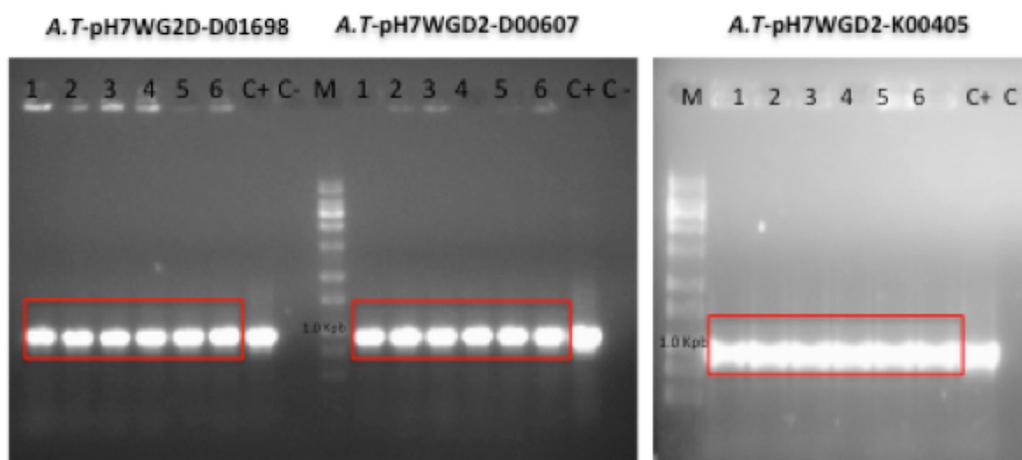


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos das PCRs de colônia de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas com os vetores pH7WG2D-*Dof*. As bandas indicadas pelos retângulos vermelhos correspondem aos fragmentos de tamanhos esperados dos produtos das PCRs de colônia dos vetores pH7WG2D-*Dof* transformados em *A. tumefaciens* EHA105. Seis colônias de cada transformação dos vetores pH7WG2D-D01698, pH7WG2D-D00607 e pH7WG2D-K00405 foram testadas. Canaletas: M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Ludwig Biotech); 1-6 indicam as colônias avaliadas para cada transformação; C+ indica o controle positivo das PCRs a partir das construções *Dof* :: pH7WG2D e C- controle negativo indica PCRs sem a presença de DNA nas reações.

5.4.3 Transformação genética de *A. thaliana* com *A. tumefaciens* EHA105::pH7WG2D-*Dof* e seleção de plantas transgênicas

A planta modelo *A. thaliana* foi escolhida para os ensaios de expressão dos genes *Dof* de *E. grandis* por apresentar características desejáveis para os estudos de genômica funcional. É uma planta de fácil manipulação, cultivo, ciclo de vida relativamente curto (6 semanas), produção de um grande número de sementes e possui o genoma completamente sequenciado. Além disso, já estão disponíveis na literatura protocolos bem estabelecidos para estudos de genômica funcional utilizando-se plantas de *A. thaliana* (KOORNNEEF & MEINKE, 2010). Como o objetivo deste trabalho é o estudo dos genes *Dof* relacionados com a biogênese do caule, a planta de *A. thaliana*, apesar de ser uma planta herbácea, apresenta-se como um excelente modelo para o estudo da formação da madeira (xilema secundário). Recentes estudos têm demonstrado que mecanismos moleculares conservados podem existir entre plantas herbáceas e árvores durante o desenvolvimento vascular e de formação da madeira. Assim, em ambas as plantas de *A. thaliana* e em árvores, várias famílias de fatores de transcrição e de hormônios vegetais contribuem para a regulação do desenvolvimento do xilema (ZHANG *et al.*, 2011).

Plantas selvagens de *A. thaliana* Col-0 foram transformadas pelo método de imersão de inflorescências com linhagens de *A. tumefaciens* EHA105 previamente transformadas com os plasmídeos pH7WG2D-D01698, pH7WG2D-D00607, pH7WG2D-K00405 e pH7WG2D (controle). Após o desenvolvimento e maturação das siliquas, as sementes foram coletadas para posterior seleção *in vitro* das sementes transgênicas. As sementes foram descontaminadas superficialmente e dispersas em meio de seleção MS contendo o antibiótico higromicina, cuja marca de resistência está presente no vetor pH7WG2D. Utilizou-se duas concentrações de higromicina (25 mg/L e 15 mg/L) para seleção de plântulas resistentes. As sementes transgênicas e selvagens germinaram normalmente em meio seletivo e, após 10-15 dias, foi possível observar-se que as plantas transgênicas apresentavam cotilédones abertos emitindo o primeiro par de folhas verdadeiras e raízes bem desenvolvidas. Já as plantas não-transgênicas, tiveram desenvolvimento limitado e não apresentaram as características anteriormente descritas para plantas transgênicas (Figura 16).

A concentração mais eficaz de higromicina para a seleção de plantas GM foi na faixa de 20 a 30 mg/L. A concentração dentro deste intervalo (25 mg/L) é geralmente estabelecida para distinguir as plantas de *A. thaliana* transgênicas das não-transgênicas (EE *et al.*, 2014). Nos nossos experimentos, a concentração de 25 mg/L resultou em inúmeras plântulas com o fenótipo de resistência, porém, não foi possível observar o desenvolvimento adequado das raízes. Isto acarretou em perda de inúmeras plantas quando transplantadas para o solo. A raiz é um órgão extremamente importante pois permite a absorção dos nutrientes do solo e seu desenvolvimento pode ser afetado por vários fatores. Segundo DUAN & DING (2007), as células na zona meristemática da ponta da raiz de mudas de *A. thaliana* cultivadas em meio MS com o antibiótico higromicina, em diferentes concentrações, são afetadas apresentando capacidade de divisão fraca, diferenciação evidente, disposição anormal e grande espaço intercelular, o que leva à restrição do alongamento da raiz principal e da formação da raiz lateral. Dessa forma, foi testada e estabelecida a concentração de higromicina para 15 mg/L na qual pode-se obter plântulas com todas as características fenotípicas desejadas de resistência à higromicina. Entretanto, inúmeras plântulas selecionadas *in vitro* foram perdidas ao longo do seu desenvolvimento. Uma considerável quantidade de plântulas em fase de seleção *in vitro* e no solo foram perdidas por consequência de contaminações fúngicas, o que impossibilitou a recuperação e desenvolvimento das plântulas. As sementes oriundas das transformações apresentaram contaminação fúngica devido à utilização de uma alta concentração de sacarose no meio de inoculação e, além disso, as plantas foram mantidas em ambiente úmido e quente, ideal para a proliferação desses contaminantes (HARRISON *et al.*, 2006).

Assim, obteve-se apenas duas linhagens de plantas transformadas para o gene D00607 e para o gene K00405 e uma linhagem contendo o T-DNA do plasmídeo controle pH7WG2D. Nenhuma linhagem foi obtida para o gene D01698. Estas mesmas linhagens serão avaliadas por PCR utilizando-se *primers* gene-específicos para a confirmação do estado de transgenia das mesmas.



Figura 16. Exemplo de imagem da seleção de plantas de *A. thaliana* transformadas com *A. tumefaciens* EHA105::pH7WG2D-*Dof* e controle em meio seletivo com higromicina. Imagem do fenótipo adquirido pela seleção de plântulas transformadas por *A. tumefaciens* EHA105 contendo o gene de resistência à higromicina. Como indicado no círculo vermelho, as plantas verdadeiramente transformadas apresentaram-se com cotilédones abertos, folhas verdadeiras e raízes vigorosas desenvolvidas em meio MS acrescido de higromicina a uma concentração de 15 mg/L.

5.5 Ensaio de localização subcelular

5.5.1 Recombinação dos genes *Dof* clonados em pENTR/D-TOPO com o vetor binário pH7WGF2 e transformação genética de *A. tumefaciens* EHA105

As reações de recombinação entre os vetores de entrada pENTR/D-TOPO-D01698, pENTR/D-TOPO-D00607 e pENTR/D-TOPO-K00405 com o vetor binário pH7WGF2 (VIB) foram realizadas utilizando-se a estratégia Gateway (Invitrogen), conforme descrito no item 4.7.1. Células termocompetentes de *A. tumefaciens* EHA105 foram a seguir transformadas, via choque-térmico, com as versões do vetor pH7WGF2 contendo os genes *Dof*. Quatro colônias

foram escolhidas para a confirmação da transformação genética por meio de PCRs de colônia utilizando-se *primers* gene-específicos. As quatro colônias de cada versão apresentaram os *amplicons* esperados para a amplificação dos genes *Dof*. Na Figura 17, é possível observar fragmentos de ~1.0 kb correspondentes aos esperados para os genes D01698 (915 pb), D00607 (885 pb) e K00405 (915 pb) ligados a pH7WGF2 e presentes em *A. tumefaciens* EHA105.

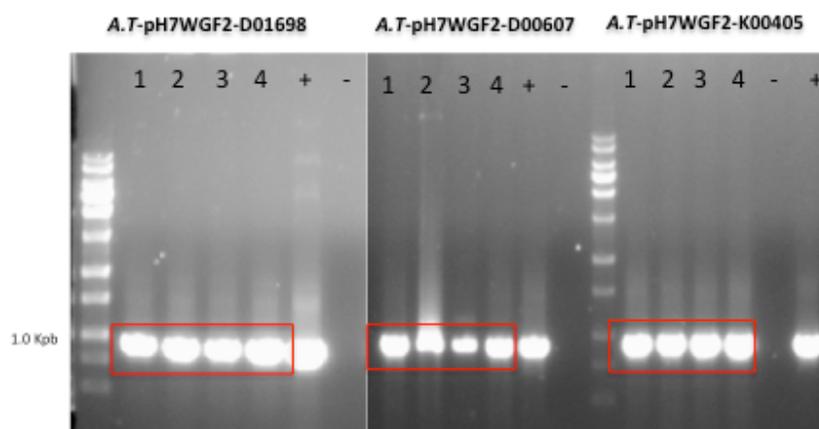


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 0,8% dos produtos das PCRs de colônia de *A. tumefaciens* EHA105 transformadas com os vetores pH7WGF2-*Dof*. As bandas indicadas pelos retângulos vermelhos correspondem aos fragmentos de tamanhos esperados dos produtos das PCRs de colônia dos vetores pH7WGF2-*Dof* transformados em *A. tumefaciens* EHA105. Quatro colônias de cada transformação dos vetores pH7WGF2-D01698, pH7WGF2-D00607 e pH7WGF2-K00405 foram testadas. Canaletas: M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Ludwig Biotech); 1-4 indicam as colônias avaliadas para cada transformação; C+, controle positivo e C-, controle negativo.

5.5.2 Análises da localização subcelular das proteínas *Dof*

Análises *in silico* da localização subcelular dos fatores de transcrição *Dof* a partir do banco de dados *Plant-mPLOC database* foram preditas no núcleo de células vegetais.

Para a investigação da localização dos fatores *Dof*, folhas de tabaco selvagem (*N. benthamiana*) com mais de seis semanas de idade foram agroinfiltradas com suspensões de *A. tumefaciens* EHA105::pH7WGF2 contendo os genes *Dof* fusionados ao gene codificador da proteína GFP em posição N-terminal, conforme descrito no item 4.7.2.

As proteínas *Dof*-GFP fusionadas foram detectadas em microscópio confocal 4 dias pós-agroinfiltração. Na Figura 18, em vermelho, estão demonstradas as imagens capturadas dos

cloroplastos para mostrar sua disposição nas células. As imagens de campo claro foram adquiridas, também, para auxiliar na identificação da localização das fluorescências na célula. A célula vegetal possui vacúolo grande, o que promove a translocação do citoplasma e do núcleo para a periferia da célula (Figura 18 A). Como controle, foi utilizado a expressão de GFP dos vetores binários pH7WGF2 e pXH2FS7 que apresentam expressão dispersa no citoplasma e no núcleo (Figura 18 A; KOKKIRALA *et al.*, 2010). O sinal de GFP derivada das células agroinfiltradas com a versão controle pH7WGF2 apresentou-se muito fraco (Figura 18 A) e o mesmo padrão de fluorescência foi detectado para as proteínas fusionadas a Dof (Figura 18 B, C e D). Um sinal difuso no citoplasma e no núcleo pode ser visualizado em células de folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com as versões de Dof-GFP. Esta mesma localização foi verificada nas folhas agroinfiltradas em todas as repetições do experimento. Entretanto, análises de localização subcelular realizadas *in silico* demonstraram que as proteínas Dof possuem sinalização para o núcleo. Uma hipótese é a de que algum sinal de regulação ou estímulo não está presente em folhas de *N. benthamiana* para endereçar as proteínas Dof ao núcleo, o que ocorre em *E. grandis*.

As proteínas fluorescentes como GFP, apesar de serem amplamente utilizadas em estudos de localização subcelular, podem ter interferido na localização das proteínas fusionadas de interesse dentro da célula (GHAZALA *et al.*, 2008). As proteínas fluorescentes fusionadas na região N-terminal da proteína de interesse podem interferir nos sinais de localização (TANZ *et al.*, 2013). A não detecção das proteínas Dof-GFP nos núcleos celulares ou a localização errônea (no citoplasma) podem ser explicadas pelo fato destas proteínas de fusão emergirem do ribossomo primeiro no citoplasma e as chaperonas presentes podem impedir que a cadeia de aminoácidos seja dobrada até um domínio completo, de 50 a 300 aminoácidos. A GFP tem 238 aminoácidos e dobra-se primeiro a partir da extremidade N-terminal, possivelmente interrompendo o correto dobramento e a localização da proteína de interesse fusionada. Em alguns casos, a proteína de interesse pode interromper o dobramento da própria GFP, isto é, alterando ou impedindo sua conformação correta para torná-la visível. A marcação C-terminal da proteína de interesse com GFP não teria o mesmo efeito, pois a GFP seria dobrada por último e não influenciaria na conformação da proteína nativa ou na GFP. Em geral, sugere-se que a marcação C-terminal de uma proteína geralmente seja superior à marcação N-terminal,

uma vez que a proteína é mais provável de se localizar corretamente e, portanto, é de se esperar que ela mantenha as características funcionais da proteína nativa (PALMER & FREEMAN 2004). Além disso, tem sido demonstrado que genes fusionados sob o controle de um promotor forte como o CaMV 35S levam a maiores níveis de expressão da construção de fusão do que genes regulados pelos seus próprios promotores e, subsequentemente, este excesso de proteínas de fusão poderia ocasionar uma localização difusa levando à errada localização, agregação, distúrbios metabólicos ou similares (TANZ *et al.*, 2013).

Outro fator que pode ter ocasionado a baixa detecção das proteínas fluorescentes se deve, possivelmente, a algum problema no vetor de expressão pH7WGF2, já que a versão parental deste plasmídeo apresentou sinal de GFP muito fraco. Já o segundo vetor plasmidial utilizado como controle, pXH2FS7, apresentou atividade de GFP com maior intensidade de fluorescência.

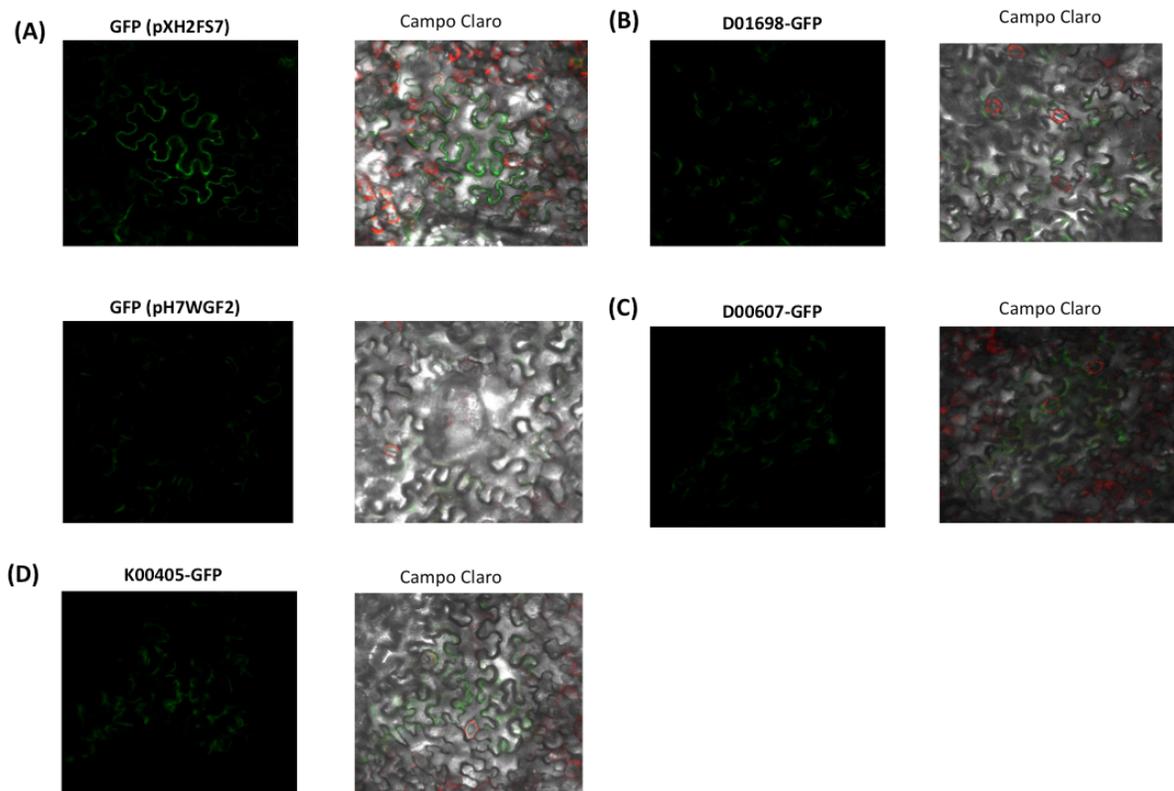


Figura 18. Análises de localização subcelular de proteínas Dof fusionadas a GFP por microscopia confocal a laser em folhas de *N. benthamiana* 4 dias pós-agroinfiltração. (A) Controles positivos da atividade de GFP pelos plasmídeos pH7WGF2 e pXh2FS7. (B) Expressão do gene D01698 fusionado a GFP (pH7WGF2-D01698).

(C) Expressão do gene D00607 fusionado a GFP (pH7WGF2-D00607). (D) Expressão do gene K00405 fusionado a GFP (pH7WGF2-K00405). A localização das proteínas Dof, como observadas nas imagens, apresenta localização conforme o controle de GFP (pH7WGF2), dispersas pelo citoplasma e no núcleo.

5.6 Expressão heteróloga de genes *Dof* em *E. coli*

5.6.1 Isolamento dos genes *Dof* a partir de pENTR/D-TOPO

As sequências codificadoras dos genes *Dof* foram eficientemente amplificadas por PCRs de alta fidelidade com a enzima *Pfu* DNA Polymerase a partir dos vetores pENTR/D-TOPO clonados previamente a cada um dos três genes *Dof* D01698, D00607 ou K00405 e *primers* especificamente projetados para permitir a clonagem dos mesmos em pGEX-4T-1, conforme descrito no item 4.9.2. A amplificação dos genes *Dof* gerou amplicons de aproximadamente 915 pb, 885 pb e 915 pb, respectivamente (Figura 19).

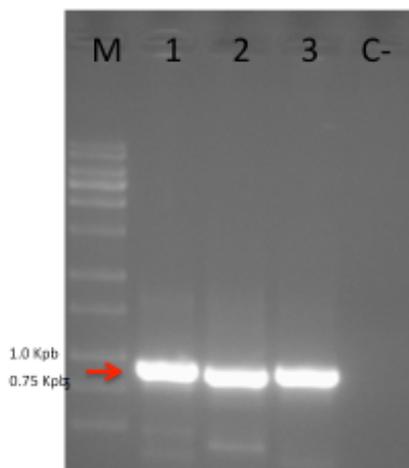


Figura 19. Gel de agarose a 0,8 % resultante da resolução dos produtos da amplificação dos três genes *Dof* ligados a pENTR/D-TOPO. A seta vermelha indica os fragmentos de tamanhos esperados pela amplificação dos genes *Dof* a partir de pENTR/D-TOPO utilizando *primers* especificamente projetados para a clonagem posterior em pGEX-4T-1. Canaletas: M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1, *amplicons* do gene D01698; 2, *amplicons* do gene D00607; e 3, *amplicons* do gene K00405; C- controle negativo da PCR sem DNA nas reações.

Os produtos das PCRs foram posteriormente purificados a partir de gel de agarose devido à presença de fragmentos inespecíficos nas reações de amplificação.

5.6.2 Clonagem dos genes *Dof* no vetor de expressão pGEX-4T-1

O sistema para a expressão recombinante dos genes *Dof* escolhido foi o vetor pGEX-4T-1 (GE Healthcare), o qual contém um promotor forte (*tac*) que proporciona alto nível de transcrição dos genes clonados, além de ser quimicamente induzível por IPTG (ROSANO *et al.*, 2014). O vetor permite a produção da proteína de interesse fusionada a GST. A GST, por sua vez, permite a purificação das proteínas recombinantes por meio de cromatografia de afinidade. Além disso, a GST pode atuar como chaperona, facilitando o dobramento das proteínas corretamente e, assim, a proteína de fusão pode ser produzida como uma proteína solúvel e não em corpos de inclusão. O plasmídeo pGEX-4T-1 contém um sítio de clivagem proteolítico reconhecido por trombina, possibilitando a clivagem de GST da proteína de interesse após a purificação da proteína de fusão (HARPER & SPEICHER, 2011).

Após as reações de ligação entre os amplicons dos genes *Dof* e o plasmídeo pGEX-4T-1, transformou-se células termocompetentes de *E. coli* OmniMAX 2. A clonagem com o vetor pGEX-4T-1 resultou em três colônias para o gene D00607, três colônias para o gene D01698 e nenhuma colônia para o gene K00405.

Os clones foram avaliados por PCRs de colônia e pode-se confirmar três clones positivos para o gene D01698 e um clone positivo para o gene D00607, com *amplicons* resultantes de ~1 kb (Figura 20). Mesmo após inúmeras tentativas de clonagem, nenhum clone de pGEX-4T-1 foi obtido para o gene K00405.

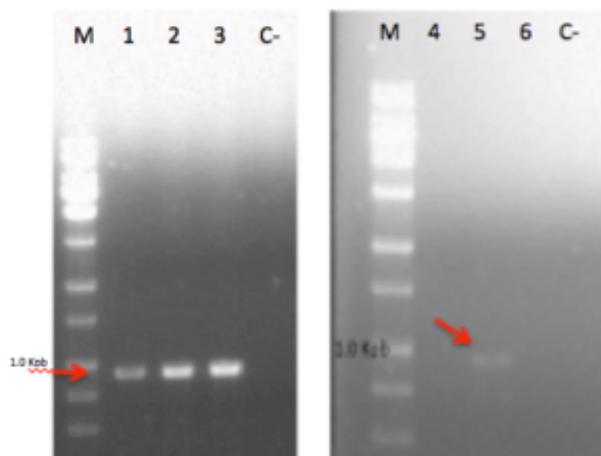


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose a 0,8 % dos produtos das PCRs de colônia de *E. coli* OmniMax 2 transformadas com as reações de ligação de pGEX-4T-1 ligado aos genes *Dof*. As bandas indicadas pelas setas vermelhas correspondem aos fragmentos de tamanho esperado dos genes *Dof* inseridos no vetor de expressão pGEX-4T-1. Três colônias de cada transformação foram testadas. Assim, 1-3 corresponde aos clones de pGEX-4T-1-D01698, 4-6 corresponde aos clones de pGEX-4T-1-D00607. Apenas os clones 1, 2, 3 e 5 apresentaram o fragmento de tamanho esperado. M, marcador de tamanhos de fragmentos de DNA 1 kb *Plus* DNA *Ladder* (Ludwig Biotech) e C-, controle negativo.

Um clone positivo de cada construção obtida em pGEX-4T-1 foi escolhido para a confirmação por sequenciamento e análise da sequência gênica. Todos os recombinantes apresentaram as sequências nas fases de leitura correta (Figuras 21 e 22).

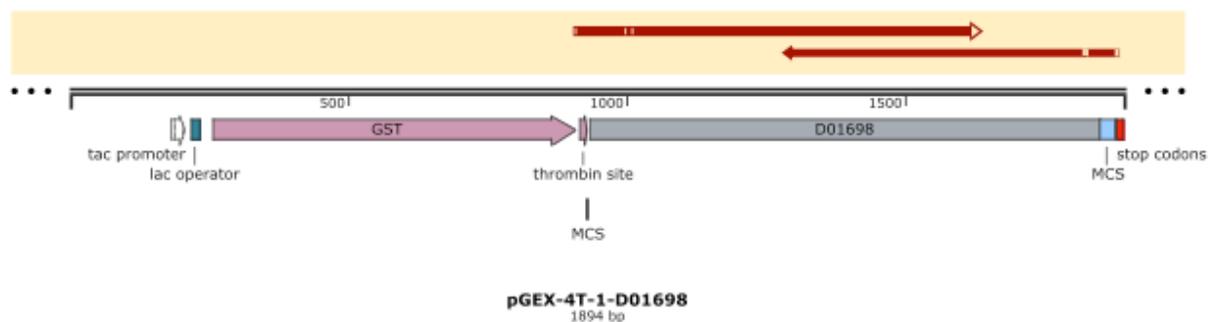


Figura 21. Mapa de cobertura do sequenciamento de pGEX-4T-1-D01698. Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das sequências nucleotídicas originais de pGEX-4T-1 e da CDS do gene D01698. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pGEX-4T-1-D01698 cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido das setas indica o *primer* (*forward* ou *reverse*) utilizados para os

sequenciamentos. Os traços brancos no interior das setas vermelhas indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

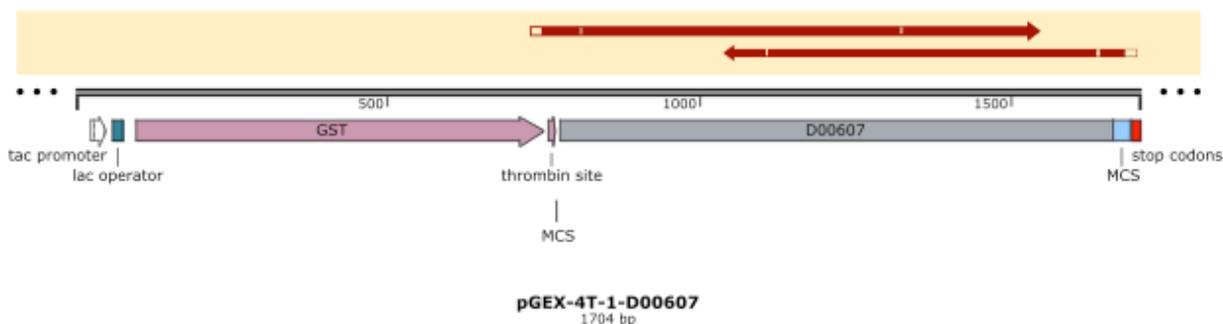


Figura 22. Mapa de cobertura do sequenciamento de pGEX-4T-1-D00607. Imagem gerada pelo emprego do programa *SnapGene 2.7.1* a partir das seqüências nucleotídicas originais de pGEX-4T-1 e da CDS do gene D00607. As setas vermelhas superiores representam os segmentos de pGEX-4T-1-D00607 cobertos pelos sequenciamentos realizados e o sentido das setas indica o *primer* (*forward* ou *reverse*) utilizados para os sequenciamentos. Os traços brancos no interior das setas vermelhas indicam *gaps* e *mismatches* identificados no alinhamento.

5.6.3 Expressão dos genes *Dof* em linhagens de expressão de *E. coli*

Os clones de pGEX-4T-1 contendo os genes D01698, D00607 e o vetor vazio (controle) foram transformados nas linhagens bacterianas de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL* e BL21 (DE3) pT-GroE conforme descrito na seção 4.9.5. Assim, por PCRs de colônia, selecionou-se três clones positivos para cada uma das linhagens transformadas com cada gene (resultados não apresentados).

Após ensaio piloto, no qual testou-se a melhor condição de indução da expressão gênica nas condições de 1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h e, em paralelo, a 20 °C por 20 h, foi verificada quais linhagens bacterianas melhor produziram as proteínas recombinantes. A escolha de uma baixa temperatura para a expressão das proteínas recombinantes justifica-se pelo fato de que baixas temperaturas diminuem a agregação das proteínas recombinantes *in vivo*. A agregação é devido a interações hidrofóbicas que são favorecidas em altas temperaturas. Além disso, a produção de proteínas em temperaturas mais baixas apresenta um

grande impacto na qualidade das proteínas produzidas. A estrutura conformacional e a funcionalidade de proteínas recombinantes altamente solúveis aumentam quando a temperatura da cultura é reduzida (ROSANO *et al.*, 2014). Uma temperatura baixa favorece a eliminação parcial de proteases “*heat shock*” expressas em condições de superexpressão (MOGK *et al.*, 2002).

Com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) Star, nenhum clone produziu as proteínas recombinantes de tamanhos esperados de acordo com análises realizadas por SDS-PAGE (resultados não apresentados). Com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL*, uma banda de tamanho esperado da proteína recombinante D01698 de peso molecular de ~58 kDa (referente aos 32 kDa da proteína Dof e 26 kDa da GST) foi observado nos clones 1, 2 e 3 na fração insolúvel da indução a 20 °C por 20 h e, no clone 2, na condição de indução a 37 °C por 3 h (Figura 23).

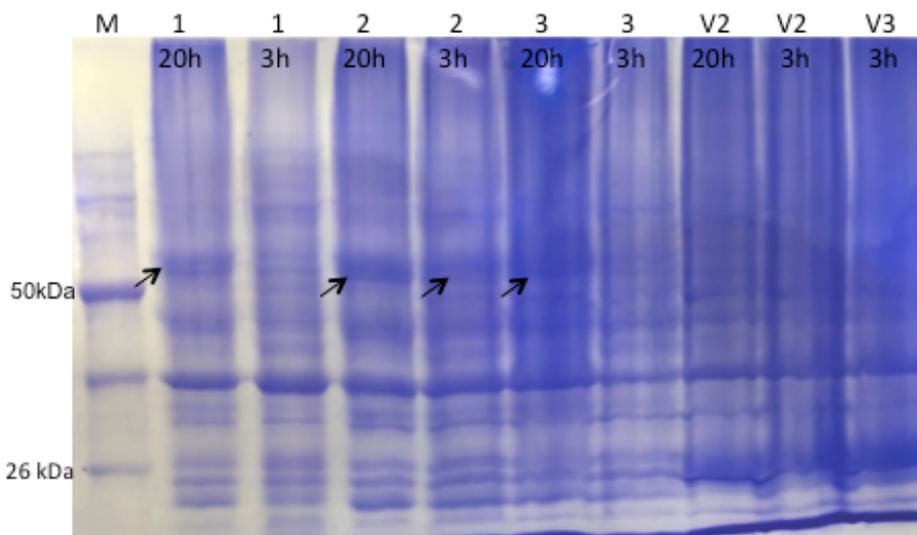


Figura 23. SDS-PAGE da resolução de extratos proteicos derivados da fração insolúvel oriundos de culturas de *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL*::pGEX-4T-1-D01698. A expressão de três clones positivos (1, 2 e 3) para cada uma das condições de indução (1 mM de IPTG por 3 h a 37°C e/ou 20 h a 20 °C) foram avaliadas. Na imagem, estão representadas pelas setas as possíveis bandas de pesos moleculares esperados da proteína D01698. Os melhores clones foram: 1-20h; 2-20h; 2-3h e 3-20h. As amostras estão representadas pelos três clones (1, 2 ou 3) e cultivadas sob os tempos de 20 h ou 3 h. As amostras V2 e V3 expressam GST (controle); M, marcador de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega).

Para confirmar a produção da proteína recombinante de interesse em *E. coli*, realizou-se o ensaio de *western blot* com anticorpos primários IgG anti-GST (Figura 24). Assim, foi confirmada a produção da proteína D01698 com massa esperada de ~58 kDa para todos os clones avaliados e selecionados em SDS-PAGE. Outros fragmentos de menor peso molecular foram também observados no *western blot*, o que possivelmente seja resultado de traduções incompletas da proteína de interesse com a GST ou mesmo pela degradação das proteínas por proteases presentes no meio (JENNINGS *et al.*, 2016).

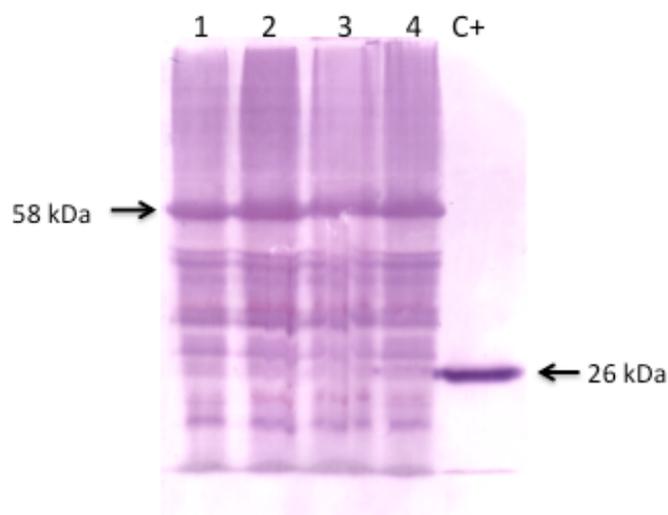


Figura 24. Western blot da proteína recombinante D01698 em extratos proteicos da fração insolúvel derivados da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL::pGEX-4T-1-D01698*. Selecionou-se os clones que tiveram melhor expressão nas condições de indução (3 h a 37 °C ou 20 h a 20 °C). As setas indicam as bandas de tamanho esperado para a proteína D01698 fusionada a GST, com massa de 58 kDa, e a banda de GST (controle), com massa de 26 kDa. As bandas restantes indicam possíveis fusões truncadas da GST com a proteína de interesse e ou degradação das proteínas. Canaletas: 1, clone 1 - 20h; 2, clone 2 - 20h; 3, clone 2-3h; 4, clone 3-20h e C+, pGEX-4T-1-vazio.

A expressão de genes eucarióticos em *E. coli* não raramente leva ao acúmulo de proteínas insolúveis em corpos de inclusão. A expressão dos genes em um sistema heterólogo pode acarretar na produção de corpos de inclusão e, assim, na insolubilidade das proteínas. Os corpos de inclusão são agregados proteicos que se formam pela deposição de polipeptídeos mal dobrados. A insolubilidade pode ser originada por auto-agregação de intermediários

conformacionais e pela agregação a componentes da membrana plasmática durante ou após a lise da célula bacteriana (WINGFIELD, 2015). Desse modo, a presença da proteína de interesse D01698 na fração insolúvel dos extratos proteicos derivados de *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RIL* representa um problema para futuros estudos estruturais e funcionais.

Assim, testou-se a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE, capaz de expressar as chaperonas GroES e GroEL presentes no plasmídeo pT-GroE sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase. Essas chaperonas estão diretamente relacionadas com o correto dobramento das proteínas e sua solubilidade (GUPTA *et al.*, 2014). Após a indução, bandas de tamanhos esperados para cada gene *Dof* foram observadas por SDS-PAGE. Os três clones do gene D00607 tiveram expressão na condição de indução a 20 °C durante 20 h e o clone 1 do gene D01698 teve sua expressão em ambas as condições de indução. Ambos os clones de cada gene tiveram sua expressão na fração solúvel, comprovando a ação das chaperonas no correto dobramento e solubilidade das proteínas recombinantes (Figura 25 A e B).

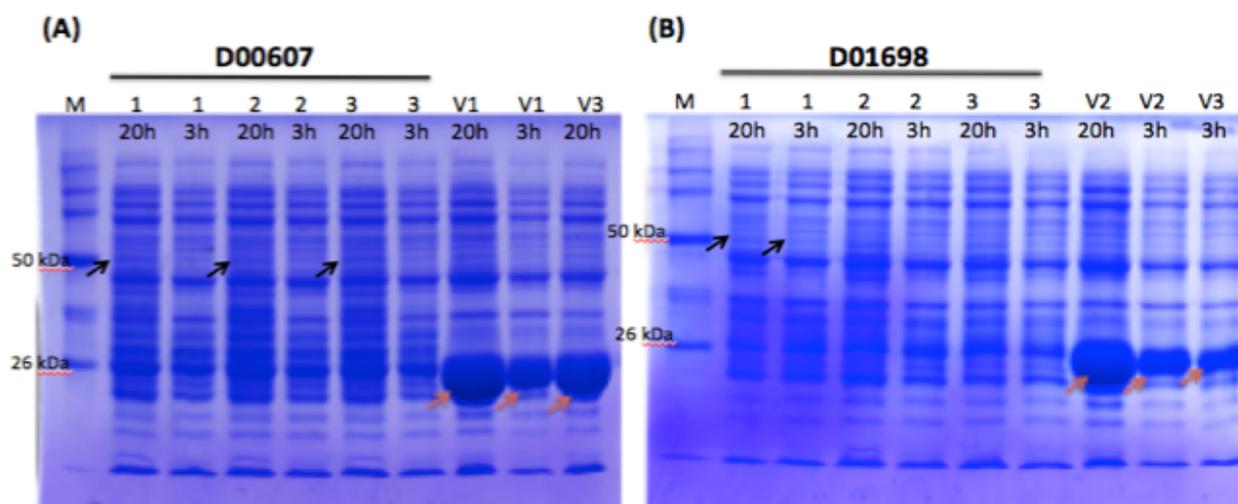


Figura 25. SDS-PAGE da resolução de extratos proteicos da fração solúvel oriundos de culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE:: pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE:: pGEX-4T-1-D01698. A expressão de três clones positivos (1, 2 e 3) para cada uma das condições de indução (1 mM de IPTG por 3 h a 37°C e/ou 20 h a 20 °C) foram avaliadas. (A) Na imagem, estão representadas pelas setas pretas as possíveis bandas de pesos moleculares esperados da proteína D00607. Os melhores clones foram: 1-20h; 2-20h e 3-20h. As amostras estão representadas pelos três clones (1, 2 ou 3) e cultivadas sob os tempos de 20h ou 3h. As amostras V1 e V3 expressam GST (controle). (B) Na imagem, estão representadas pelas setas pretas as possíveis bandas de pesos moleculares

esperados da proteína D01698. Os melhores clones foram: 1-20h e 1-3h. As amostras estão representadas pelos três clones (1, 2 ou 3) e induzidos pelos tempos de 20h ou 3h. As mostras V1 e V3 expressam GST (controle). As setas em vermelho indicam as bandas de GST (26 kDa). M, marcador de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega).

Para confirmar a produção dos clones promissores foi realizado um ensaio de *western blot* com anticorpos primários IgG anti-GST (Figura 26). Assim, foi confirmado a produção das proteínas D00607 com tamanho de banda esperada de ~57 kDa (referente aos tamanhos de 31 kDa da proteína e 26 kDa da GST) para todos os clones avaliados. Apenas o clone um (1) do gene D01698 induzido a 20 °C durante 20 h apresentou uma fraca banda no tamanho de ~58 kDa (Figura 26). Outros fragmentos de menor massa molecular e foram novamente detectados no *western blot*.

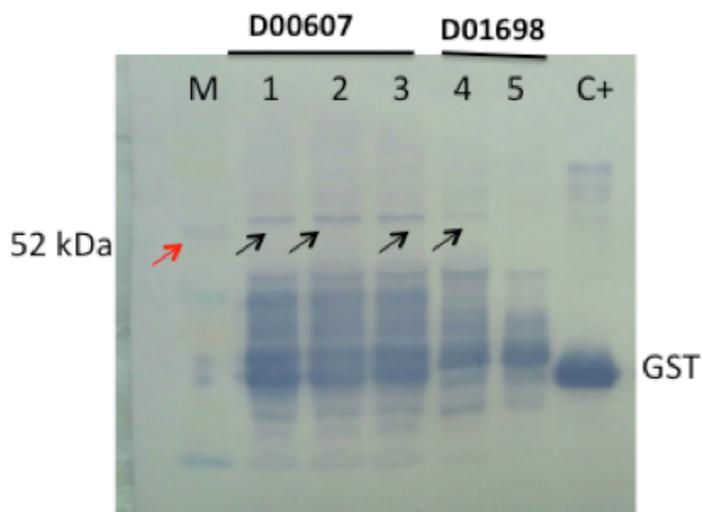


Figura 26. Análise por *western blot* da presença das proteínas recombinantes Dof em extratos proteicos da fração solúvel derivados da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE::pGEX-4T-1-D01698. Selecionou-se os clones que tiveram melhor expressão nas condições de indução (3 h a 37 °C ou 20 h a 20 °C). As setas indicam as bandas de tamanho esperado para as proteínas D01698 e D00607 fusionadas a GST, com massa de ~ 57 kDa, e a banda de GST (controle), com massa de 26 kDa. As bandas restantes indicam possíveis fusões truncadas da GST com a proteína de interesse e ou degradação das proteínas. Canaletas: M, marcador de peso molecular *Rainbow Marker- Full Range* (Amersham); 1, D00607- clone 1-20h; 2, D00607- clone 2-20h; 3, D00607- clone 3-20h; 4, D01698- clone 1-20h; 5, D01698- clone 1- 3h e C+, pGEX-4T-1-vazio.

5.6.4 Produção das proteínas Dof em maior escala e purificação a partir de culturas de *E. coli*

As linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE correspondentes aos clones 1 de pGEX-4T-1-D00607 e 4 de pGEX-4T-1-D01698 foram escolhidas para a produção das proteínas recombinantes em maior escala. A linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE foi a única na qual as proteínas Dof D01698 e D00607 acumularam-se na fração solúvel. A condição de indução a 20 °C durante 20 h com 1 mM de IPTG foi a escolhida para a expressão gênica em 500 mL de meio de cultura 2XYT acrescido de 1 % de glicose. A adição de glicose ao meio mantém baixa a expressão da T7 RNA polimerase, prevenindo a indução não-intencional das proteínas (STUDIER, 2005). As células foram lisadas e o sobrenadante aplicado na resina cromatográfica, conforme descrito na seção 4.9.8.

A purificação das proteínas D01698 e D00607 foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando-se a resina de Glutathione Sepharose. Em paralelo, foi realizada a expressão da cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE carregando o plasmídeo vazio para a produção das proteínas nativas (controle) da bactéria e de GST. As frações enriquecidas com as proteínas Dof fusionadas com GST foram eluídas com tampão de eluição contendo glutathione reduzida. As frações das purificações foram analisadas por SDS-PAGE e *western blot*.

A purificação das proteínas D01698 e D00607 não foi bem sucedida. Como demonstrado na Figura 27A e 27B, uma banda muito fraca possivelmente correspondente à proteína eluída D00607 é detectável em ~57 kDa por SDS-PAGE e por *western blot*. Nenhuma banda de tamanho esperado foi detectada para a eluição da proteína D01698. Possivelmente, isso ocorreu devido à expressão de fragmentos truncados das proteínas de interesse fusionadas à GST na porção N-terminal e/ou pela clivagem por proteases produzidas pela bactéria. Além disso, a adição de glicose pode representar uma desvantagem, ocasionando a baixa expressão ou a inibição da produção das proteínas recombinantes. Após a fase de rápido crescimento inicial, os produtos da degradação metabólica da glicose tornam a cultura muito ácida e, assim, acarretam menor densidade celular na fase estacionária (STUDIER, 2005).

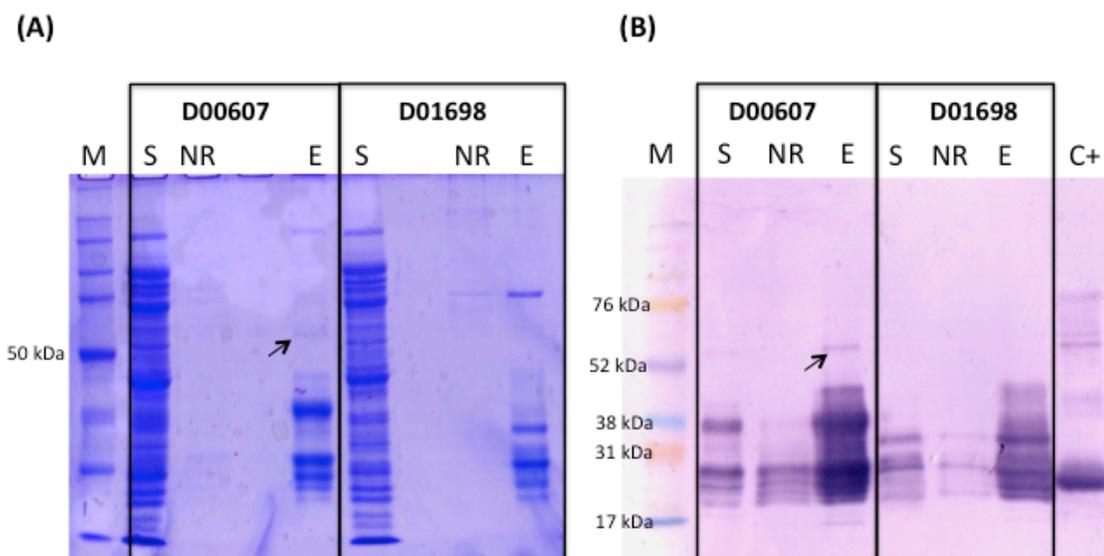


Figura 27. SDS-PAGE e análise por *western blot* de extratos proteicos derivados da fração solúvel oriundos de culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1-D00607 e pT-GroE::pGEX-4T-1-D01698 e da purificação das proteínas recombinantes Dof. **(A)** Análise por SDS-PAGE da resolução de extratos proteicos na fração solúvel (S), das proteínas não retidas na coluna (NR) e das eluições das proteínas ligadas pela coluna após adição de glutatona reduzida. M, marcador de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega). **(B)** Análise por *western blot* para a confirmação da presença dos produtos observados pela purificação das proteínas Dof recombinantes. Estão indicadas as proteínas totais na fração solúvel (S), as proteínas não retidas na coluna (NR) e as eluições das proteínas ligas a coluna após adição de glutatona reduzida. M, marcador de peso molecular *Rainbow Marker- Full Range* (Amersham); C+, pGEX- 4T-1-vazio (controle). As setas indicam a banda com tamanho de ~60 kDa da purificação das proteínas.

Uma vez que não se obteve qualquer expressão do gene D01698 nas condições testadas, a expressão foi repetida nas mesmas condições de indução, porém, sem a adição de glicose a 1 %. Após a indução das bactérias em cultura e a lise, a purificação das proteínas foi realizada novamente nas mesmas condições anteriores. Como representado na Figura 28, uma banda muito fraca pode ser visualizada próximo a 52 kDa pelo ensaio de *western blot* (Figura 28B). Como conclusão, a glicose a 1 %, utilizada anteriormente, realmente havia inibido a expressão do gene D01698.

Embora as proteínas Dof D00607 e D01698 tenham sido detectáveis nas frações solúveis dos extratos proteicos derivados de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE contendo as respectivas versões de pGEX-4T-1-Dof, a expressão dos genes Dof foram muito baixas, sendo necessário testar novas condições de indução para melhorar a produção e acúmulo das proteínas

codificadas. Para isso, um meio mais rico de autoindução, contendo lactose, poderá ser testado como primeira alternativa.

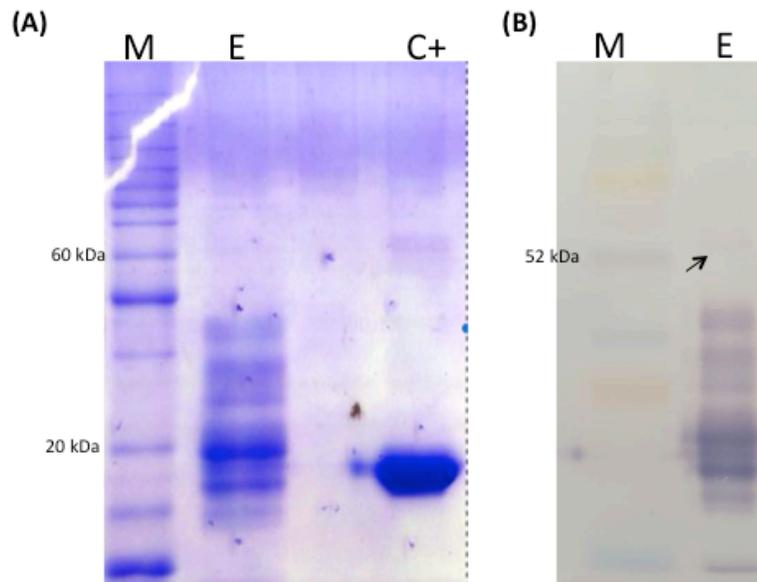


Figura 28. SDS-PAGE e análise por *western blot* da purificação dos extratos proteicos derivados da fração solúvel oriundos de culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE::pGEX-4T-1- D01698. (A) Análise por SDS-PAGE da resolução da eluição (E) da proteína ligada pela coluna após adição de glutatona reduzida. M, marcador de peso molecular *Broad Range Protein Molecular Weight Marker* (Promega); C+, pGEX- 4T-1-vazio (controle). (B) Análise por *western blot* para a confirmação da presença dos produtos observados após a eluição da proteína liga a coluna. M, marcador de peso molecular *Rainbow Marker- Full Range* (Amersham). A seta indica a banda com tamanho de ~60 kDa do produto da purificação da proteína D01698 ligada a GST.

O sistema de expressão utilizando o vetor pGEX-4T-1 foi escolhido pois, como relatado previamente, a fusão de proteínas de interesse à uma *tag* grande de afinidade, como a GST, pode apresentar grandes vantagens. As principais características são o aumento da expressão, da solubilidade (a superfície hidrofílica da GST promove a solubilidade da proteína fusionada), da proteção contra proteólise, do aumento do empacotamento (*folding*) e da estabilidade das proteínas na fração solúvel (ZHAN *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2012). Entretanto, neste trabalho, a utilização da *tag* GST não apresentou as características previamente mencionadas. Conforme os resultados apresentados, uma baixa expressão dos genes e o baixo acúmulo das proteínas recombinantes correspondentes na fração solúvel da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE foram detectadas. Além disso, foi obtido uma maior

acúmulo da proteína Dof D01698 na fração insolúvel da linhagem *E. coli* BL21 (DE3)
CodonPlus-RIL.

6. Conclusões e Perspectivas

No presente trabalho, plantas de *A. thaliana* foram geneticamente modificadas para expressar os genes *Dof* D01698, D00607 e K00405 de *E. grandis* como passo inicial às futuras análises que visam elucidar a função dos mesmos, uma vez que não há, na literatura, qualquer estudo funcional das proteínas *Dof* de *Eucalyptus*. Ao longo do processo de seleção das plantas transgênicas resistentes ao antibiótico higromicina, várias plântulas foram perdidas por contaminação por fungos *in vivo* ou no solo. Dessas plantas, obteve-se apenas duas linhagens transformadas com o T-DNA de pH7WG2D contendo o gene D00607, duas linhagens para o gene K00405 e nenhuma linhagem foi obtida para o gene D01698. Essas linhagens deverão ser avaliadas por PCR e hibridização por Southern *blot* para a confirmação do estado de transgenia das mesmas. Um número maior de linhagens de plantas transgênicas deverá ser obtido e, assim, as plantas deverão ser cultivadas até a obtenção de linhagens homozigotas para os genes *Dof*. Após isto, a caracterização molecular das plantas GM deverá ser realizada para confirmação da transgenia por PCRs e Southern *blots*, determinação dos níveis de mRNA por RT-qPCR e a determinação da presença das proteínas *Dof* por imunodeteção. Estudos anatomorfológicos deverão ser conduzidos para determinar alterações dos fenótipos resultantes da expressão dos fatores *Dof* em *A. thaliana*. As plantas transgênicas de *A. thaliana* capazes de expressar os genes *Dof* poderão apresentar fenótipos promissores do ponto de vista de formação dos tecidos vasculares e crescimento/desenvolvimento, o que é de particular relevância para a agrossilvicultura. Além disso, tratamentos com o regulador de crescimento citocinina poderão ser testados a fim de avaliar o fenótipo resultante nas plantas transgênicas.

O estudo da localização subcelular das proteínas *Dof* foi realizado por agroinfiltração em folhas de *N. benthamiana* de linhagens de *A. tumefaciens* EHA105, portando versões do plasmídeo pH7WGF2, capaz de promover a expressão dos genes *Dof* em fusão com o gene codificador da proteína GFP. Como resultado destes ensaios, os sinais de GFP foram muito

fracos e difusos no citoplasma e no núcleo das células vegetais. Novos experimentos de localização subcelular deverão ser realizados, testando-se plasmídeos de fusão com a GFP C-terminal. A expressão transiente e a localização subcelular das proteínas Dof poderão ser avaliados em protoplastos de *A. thaliana*. Embora represente um método muito mais laborioso, espera-se que a qualidade das imagens seja muito superior em virtude da menor complexidade estrutural, decorrente da ausência da parede celular (YOO *et al.*, 2007) e, como consequência, maior confiança nos resultados de localização das proteínas fusionadas.

Por fim, os estudos de expressão dos genes *Dof* de *E. grandis* no sistema de expressão heterólogo em *E. coli* resultaram na expressão de duas proteínas Dof, D01698 e D00607. As proteínas foram produzidas nas frações solúveis da cepa *E. coli* BL21 (DE3) pT-GroE. A presença das proteínas recombinantes foi verificada por ensaios de *western blot* e a purificação das mesmas foi tentativamente realizada por cromatografia de afinidade a GST. No entanto, não se obteve sucesso na purificação das proteínas em estudo. Novos ensaios de expressão deverão ser realizados a fim de se aperfeiçoar os passos de purificação ou, ainda, de aumentar a expressão dos genes e acúmulo das proteínas codificadas. A confirmação adicional da identidade das proteínas obtidas poderá ser avaliada por espectrometria de massas. Uma vez estabelecidas as ótimas condições de expressão e purificação, análises funcionais e de caracterização das proteínas Dof poderão ser realizadas como, por exemplo, a caracterização funcional via gel *shift* e especificidade de ligação a promotores vegetais. Além disso, com a proteína purificada, poder-se-á produzir anticorpos Dof-específicos para futuros ensaios de imunoprecipitação de cromatina, seguido por sequenciamento de nova geração (*ChiP-Seq*, do inglês, *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*), o que permitirá identificar os genes-alvo de regulação e os locais de ligação dos fatores de transcrição Dof ao DNA.

7. Material Suplementar

7.1 Sequências dos Genes *Dof*

As sequências genômicas, codificadoras (CDS) e deduzidas das proteínas dos genes D01698, D00607 e K00405 estão representadas abaixo. As sequências 5'-UTR estão representadas em verde e as sequências 3'-UTR em rosa. Por fim, as CDS estão representadas em cor azul.

Gene D01698

Sequência genômica do gene D01698:

```
>Eucgr.D01698 | Chr04:30508924..30511287 forward
TAGGACGTCCAGACACCCTCAAACATTCCTTTTCCTGCTTTCATAACCAGCTTCAACTAAAGCAGCTCATCT
CTCTCTCTCTCTTTTCTCTTTTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCCAAAAGCCAACCTATATCTTTGCCATCC
CTTTTAATCAAGAGCTCCCATCCATGGACACCGCTCAGTGGCCACAGGTAAGATAGATCCATCCATGTCCTT
TCTCTCACTCGATCTGCATCATCTCCTTCCTCTCTCTCTCTCTTCTTTTCCTTCTTGATGATTTGGCTGCTA
ATAAAGGGTAAAGTGATGCTGTTCTTTGAAGATGAAAGACGATCACTTCTTTTCTTTTTCCTCTCTCACC
TCACATAATAGCTGAGTGCAAAGTCTTTACTCTCCTTTGAATTCGGTCGTGCCTGTTATTGATAGTGTTTTC
CACTTTCCTTCTCCTTTTCAATTACAGTCACCGAGAAAAAAGAAAAAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGGAG
AGAGAGAGAGAGACGGTGCATTTTTATTTTCTGGGCTGATGCCAACTTTGAAAAAGTAAAAAGTGGGCTGTT
TTTGCTTTGTTTGTGGTCTCGCTTTGTTGGTTTGTGTTACCTTCTTCCGTGTTTGTCTTCTCAGATTTTCA
GGGTGATCTTCCCTTGTGTTTTGATCTTCATCTGCTCATGCTGCTACGGTTTCTTGATGCCTCTTTCATTT
CCCTTTTTCGGCCTTTTTTTCTTTAGGAGATTGTGGTGAACCAATAGAAGATATAGTCACAAGCACATGC
ACGGCAGCAGCCACCCCAAAGCCATCATCATCTTCGGTTTCGGAGAGGAAGCCAAGGCCGAAAAGGAACAA
GCCCTCAACTGCCAAGATGCAACTCCACCAACACCAAGTTCTGCTACTACAACAACTACAGCCTCACCCAG
CCCAGGTACTTCTGCAAGACCTGCAGGAGGTACTGGACTGACGGTGGGTCCCTCAGGAACATCCCTGTGGGC
GGTGGCTCCAGGAAGAACAAGAGATCATCGTCCCTCAGCATCATCTTCTTCCCTCGTCTTTC AATTCCATCC
AAGAAGCTGCCTGATCTGATCAGCACACCTGCGTCTGAACCCTAACAACAAAGTGACACTTCATGAAGGCCAA
GATCTGAACCTGGCCTTCCCAAACCCCTACCATCATGATTTCAAGTCCATCTCTGAGCTGGTCCAAGTGCCA
AGCCTTGAGGCCAGCAAGAACCACCATATCTCTGCTAACTCTAGCTCCGCCGGTGCTTCCATGGCACCGCCG
CAGCTCTCGGCTCTGGAGCTGCTCTCGGGGATAACGTCGAGAGGTAGTTTCAGTTCGTTTCATGTCGATGCC
GTCCACGATCCAGGCTCCGTCTACACGCCCTGGGCTGTTGCACTGCCGGACTTCAAGCCGACCCTCAATTTT
TCTCTTGATGGCCTTGGGAGTGGGGGTTATAGGAGCCTCCCTAGTGTGCAAGAGGGTGGCACTAATGGAGGG
AGGCTCTTGTTCCTTTGAAGATTTGAAGCCAGTCTCAAGCACGAGTGATATGGAGCAGAATAGAGGAGAT
CAAGGAGACTCCAATGGATACTGGAGTGGGATGTTGGGTGGCGGATCGTGGTAAAGAATTAGTTTCAGATTA
ATGAAACAGAAAAAAGAGAATAAATAATGAGTTTCTAGTTGTTCTTCTTTGGGTGTTAATTTACTTTA
ATATCATCAGTTTCTCTCTGGTGGTGGCCGTGGCGGTGGCGGTGGCGGTGGTGGGTACATTTTCTTATGACT
TGTTGATTTTTCTTGGAAACTAACAGATGATAGGCTTATCGAGTGGGTTCCTTCTCTCTATCTCTATTC
ATTACTAGCCCTCTTCATTGTCTTCTTGCCTTGTGAAGACTGTTGGAGGGAATTGAAGCTTTCCTTTAGCG
TGTAGGGTTCAGTTC AAGATCAAAAAGCTCCCTCTGCATGTATGACTGTTGTATCGAAGGGGGATATGG
ATTCGAAAAGGTGAGTTAATTAATGCCATTTTTTTAGGGCATTTGAACGGGTGAGGGCATGAATTTTGCTC
ATCACTTCATCCTTCATCTTCCACACCCACGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
```

AGAGAGAGAGAGGGAGGGAGGGAAGGAGAGAGAGAGAGAGTAGAAAAGTAACCCAGGTTTTATGTATGTTTGA
TGTTTGGTTTTGGGTTAAATTTAGACATGTTATGCTGTAATTGCACAATTAGTTCAATGAATTATATAGTTC
CTAATATTTCTACTGAACACTGTATCCTATTATCTGATCCTATGCAGATCTTTTGTTTTC

CDS do gene D01698:

>Eucgr.D01698.1 CDS

ATGGACACCGCTCAGTGGCCACAGGAGATTGTGGTGAAACCAATAGAAGATATAGTCACAAGCACATGCACG
GCAGCAGCCACCCCAAAGCCATCATCATCTTCGGTTTTCGGAGAGGAAGCCAAGGCCGAAAAGGAACAAGCC
CTCAACTGCCAAGATGCAACTCCACCAACACCAAGTTCTGCTACTACAACAACACTACAGCCTCACCCAGCCC
AGGTACTTCTGCAAGACCTGCAGGAGGTACTGGACTGACGGTGGGTCCCTCAGGAACATCCCTGTGGGCGGT
GGCTCCAGGAAGAACAAGAGATCATCGTCCCTCAGCATCATCTTCTCCTCGTCTTTCAATTCCTCATCCAAG
AAGCTGCCTGATCTGATCAGCACACCTGCGTGAACCTAACAACAAGTGACACTTCATGAAGGCCAAGAT
CTGAACCTGGCCTTCCCAAACCTCACCATCATGATTTCAAGTCCATCTCTGAGCTGGTCCAAGTGCCAAGC
CTTGAGGCCAGCAAGAACCACCATATCTCTGCTAACTCTAGCTCCGCCGGTGCTTCCATGGCACCGCCGCAG
CTCTCGGCTCTGGAGCTGCTCTCGGGGATAACGTCGAGAGGTAGTTTCAGTTCGTTTCATGTGATGCCCGTC
CACGATCCAGGCTCCGTCTACACGCTGGGCTGTTTCGCACTGCCGGACTTCAAGCCGACCCTCAATTTCTCT
CTTGATGGCCTTGGGAGTGGGGGTATAGGAGCCTCCCTAGTGTGCAAGAGGGTGGCACTAATGGAGGGAGG
CTCTTGTTCCTTTGAAGATTTGAAGCCAGTCTCAAGCACGAGTGATATGGAGCAGAATAGAGGAGATCAA
GGAGACTCCAATGGATACTGGAGTGGGATGTTGGGTGGCGGATCGTGGTAA

Sequência da proteína D01698:

>Eucgr.D01698.1

MDTAQWPQEIIVVKPIEDIVTSTCTAAATPKPSSSSVSEKPRPQKEQALNCPRCNSTNTKFCYNNYSLTQP
RYFCKTCRRYWDGGSLRNIPVGGGSRKNKRSSSSASSSSSSFNSSSKLPDLISTPASNPNNKVTLHEGQD
LNLAFPNPHHDFKSI SELVQVPSLEASKNHHI SANSSSAGASMAPPQLSALELLSGITSRGSFSSFMSPV
HDPGSVYTPGLFALPDFKPTLNFSLDGLSGGYRSLPSVQEGGTNGRLLFPFEDLKPVSSTSDMEQNRGDO
GDSNGYWSGMLGGGSW*

Gene D00607

Sequência genômica do gene D00607:

>Eucgr.D00607 | Chr04:11425442..11426515 reverse

ATGGAGCAAGAGAGCAAGCCACCGCCGCTGGATCGGAGGCCGACATCGAGGCCGCCCAACCGGACGGACAG
CAACAGCCCGCCGCCGCCACCAGCCCCAGAAGTGCCCTCGCTGCGACTCCATGAACACCAAGTTCCTGC
TACTACAACAACACTACAGCCTCTCCAGCCCCGCTACTTCTGCAAGACCTGCCGCCGCTACTGGACCCACGGC
GGAACCTAAGGAACGTCCCCGTGGCGGGCGGCTGCCGGAAGGCCAAGCGCTCCAAGTCTCTCTCTCTCTCC
TCCTCCACATCCGCCTCCGCCTCCTCCGGCGACAGCCTCACCCGCACTCATCCCTGCAGGTCTCTGCCTCAA
AGCCTCAGGGATGTTGCAGCTGGGAACCTGGCCCCACCGCCGCGCGGCGGGGAGGGGCTCTGGGT
TACTCGTTCTATCCGGGAGGTGGGTCTTGTCTCTTTGGCGGCAGTTCAGTCTATCAACAGGACGCCCT
TTCAACATTTGGGGGTGCTACAACAAGTAACAACAACAGCAGCAACAATTTGGGCTTTTTTCCAAGGTTTGGG
GGTTTGGCTTTCCTTAAGCAGCTCTCACCACCAGCAGATTCATCAACAAGCACAGTTTCTTCAGAGCGAT
TGGAGTCACGGCTTCGGCATGGGCAGTAATGCTAATACCGGTAGTAGTAGCAGTAACAATAATAGCCCTACT
ATTTACATGTACATCATCAGCATGGTAACTTGTGGAGTGGAAGCACGAGCGCTGGTATTAGCGGTCACGGT

```
GGCGGCGAGAGTAATAGAATCGGTCTGAATGTTAACCGCCCATCCGATCATCACCCTTGCCCCATCTTCCA  
GGATTTGGCCCTCCTCCATAAGCTCTTCTTTCACATGATCAGTTGCTTCTGTGTTTCAAATTTAAAGTTTG  
GAATTAGCTTCTTGACGACGACGACGACTTTTTAGGTTATAAGATTCTTTGTCAAATTTTTCCATAACAATA  
CACTGGTGGTGTGCTGAGTTTAGTTTTGTGGGATACAAATGAGGAATTGTATGAAATATTATTATGGT
```

CDS do gene D00607:

>Eucgr.D00607.1 CDS

```
ATGGAGCAAGAGAGCAAGCCACCGCGCTGGATCGGAGGCCGACATCGAGGCCGCCCCAACCGGACGGACAG  
CAACAGCCGCGCCGCGCCGACACCAGCCCCAGAAGTGCCCTCGCTGCGACTCCATGAACACCAAGTTCTGTC  
TACTACAACAACACTACAGCCTCTCCAGCCCCGCTACTTCTGCAAGACCTGCCGCGCTACTGGACCCACGGC  
GGAACCCTAAGGAACGTCCCCGTCGGCGGGCTGCCGGAAGGCCAAGCGCTCCAAGTCTCTCTCTCTCTCC  
TCCTCCACATCCGCTCCGCTCTCCGCGGACAGCCTCACCCCGCACTCATCCCTGCAGGTCTGCCTCAA  
AGCCTCAGGGATGTTGCAGCTGGGAACCTGGCCCCACCGCCGCGCGGGCGGGGAGGGGCTCTGGGT  
TACTCGTCTATCCGGGAGGTGGGTCTTGTCTCTTTGGCGGCAGTTCAGTCTATCAACCAGAGCCAGCCC  
TTCAACATTTGGGGTGCTACAACAAGTAACAACAACAGCAGCAACAATTTGGGCTTTTTCCAAGGGTTTGG  
GGTTTGGCTTCTTAAGCAGCTCTCACCACCACCAGCAGATTCATCAACAAGCACAGTTTCTTCAGAGCGAT  
TGGAGTCACGGCTTCGGCATGGGCAGTAATGCTAATACCGGTAGTAGTAGCAGTAACAATAATAGCCCTACT  
ATTTACATGTACATCATCAGCATGGTAACCTTGTGGAGTGGGAAGCACGAGCGCTGGTATTAGCGGTCACGGT  
GGCGGCGAGAGTAATAGAATCGGTCTGAATGTTAACCGCCCATCCGATCATCACCCTTGCCCCATCTTCCA  
GGATTTGGCCCTCCTCCATAA
```

Sequência da proteína D00607:

>Eucgr.D00607.1

```
MEQESKPPPLDRRPTSRPAQPDGQQQPPPHHQPQKPCRCDSMNTKFCYNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTHG  
GTLRNVVGGGCRKAKRSKSSSSSSSTSASASSGDSLTPHSSLQVLPQSLRDVAAGNLAPPPAAAAAGEGPLG  
YSFYPGGGFLSSLAAVQSINQSQPFNIGGATTSNNNSSNNLGFQFGGLASLSSSHHHQOIHQQAQFLQSD  
WSHGFGMGSNANTGSSSSNNNSPTISHVHHQHGNLWSGSTSAGISGHGGESNRIGLNVNRPSDHHHPLPLP  
FGFPPP*
```

K00405

Sequência genômica do gene K00405:

>Eucgr.K00405 | Chr11:3626626..3628658 forward

```
GGCGATTTCTTCTCAAACACTCCATTAAAGGCTTTTTTTTCTCTCCTCTCTTTTCTCTCTTTTCCCAGTCT  
TCCCTTCACCTTTTTCAGCTCCCTCTTAAGCCATGGACAACCGCAGCCCCATCTCAGTGGACTGCACAGGTAC  
TCTCTCTCTCTTCCCCAATAACAATCATTTTTCGGCTCAAGATTTTCTCTGCTCGAGTTGGTAGTTGGGGGCT  
TTGTGGATAAAAACTTTTCTCTCTTTGTTTCGATTGCTTTGTTCCCTTCCCCCTTCGACTTCAAATCATAAA  
GAAAAAAGAGAGGGGGAGGAAAGAAAAAAGTTACCTTTTTCTCCCCACGAGATGATGTTTCAGCAAGCAAAG  
CCCTCCACTAAATACGCTTGAATATATGTTGCTGTGTTTTGGAGATCTTCTCGAGTCTTGAAGTACTG  
CCGACTTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT  
TGATAATTTGTTTGTGTTTGTCTCTTCTTGGCATAATCACTCTTCCAAAAGCCTTCAAAGCACACCTTCTTTG  
CTTTGGTTTTCTGTCTTTTTGTGTTGTTTCTGCTCTTATTTCCCTTGTCTGTCTCTATTTCATCTGTTTT  
TCTTCATGCCTTCCCTTCCCTTCCCTATGGTTGTTTGAATTTCAAGGATTCCTTGGGGTGATTAATAATAA  
CCCCCAATGGAATAGCATCATCACCGAGGCCCGTGTCCGTGAGCTTGCAAGAGATCAAGCCTACATGTGG  
AACCACAACAACGAGCAGGCCGATAAGGATCAAGCCTGAACTGCCCCAGGTGCAGTTCAAGCAACACCAA
```

```
GTTCTGCTACTACAACAACACTACAGCCTCTCTCAGCCAGATATTTCTGCAAGACCTGTTCGGAGGTACTGGAC
TGAGGGTGGGTCCCTCAGGAACGTCCCTGTGGGTGGCGGCTCCAGGAAGAACAAGAGACCCTCTTCGTCATT
TTCTTCTTCGCCATCATCGAAGATCATCAAGCTTCTGATCTGGTGGTGGGCCCCGTCAGTCTTCTCAAAA
CCCTAAGACCCATGAAGCCAACGAGACCTAACTTAACATACCCACCTGATACTACTCCTACTACTGATCA
ACAAAATCCCAAGAGTAGCAGTGGAATTATTGCTTCTTCTCAATGGGATTGAGCTTAAGCTCCTTCATGCC
GCACATGCCTGTAGCATCTGACTCAAGCTCCAACCTTTTATGCGGCCGGTGGCTTGAATTTCCAGCATCTCCT
TGGTCTCAAACCGACGACATCCTCATTCGGTAGTTTTTCTGGACATGGGTTTGAGAGTGGTGGCTTTCTCGG
AAGCCTCAAAGGTTGCAAGAGAGCGGCAATGGTGACGACAGTAATGATGGTGCGAAGCTGTTTTTCTCCTGT
GGAGGATGGTTTGAAGCATCAAGTGACCAGTACTCCTCGTGTGATGGTCAGTTTGGTCTTCAAAGTAGAGG
ACAAGGAGATCATTCAAATGGGTATTGGAATGGAGTGCTGGGCACTGGAGGATCATGGTGATTGATTGAGAA
AGATTGGTATTCGATCATCATCACACGCTTCAAGGGTTTTGATTTTTTTTTCTTTAACCTTTTATTTCTTCT
CTTCTTGGGATTGGATCGACTTGGTTGGGCTGGGGCGTTTTGATGGGAACTAACAAATCAGGGTTACATGGGAT
TTTTAACCCTTTTCTTTCTTTCTTTTGCCTATTATTTTTCTCTCTCCCTTTGTCTTTGAAGCTCATTTTG
GGGTTGGCTTCAGAAGCTAGTCTGGGAATACTGTATTAGGTGTTCTCAAGCGTGGTATAGAGAGTTAGAGAT
TTAAAGCTTAAACGAAGTCAGATGGGTCTCGTCTACTCAGTTTGTACAGTTTCAAGATGTCTGAATGGTTGA
TTGCTAATTATCTGTACGAGCATGTTCACTGTTGTTTGTGTTTCTTTTTACCCCTGAGCATGAATGAGTT
GGAATGATGGCAGACAA
```

CDS do gene K00405:

>Eucgr.K00405.1 CDS

```
ATGGACAACGCAGCCCCATCTCAGTGGACTGCACAGGGATTCCCTTGGGGTGATTAATAATAACCCCCAATG
GAAATAGCATCATCACCGAGGCCCGTGTCCGTGAGCTTGAAGAGATCAAGCCTACATGTGGAACCACAACA
ACGAGCAGGCCGCATAAGGATCAAGCCCTGAACTGCCCCAGGTGCAGTTCAAGCAACACCAAGTTCTGCTAC
TACAACAACACTACAGCCTCTCTCAGCCCAGATATTTCTGCAAGACCTGTTCGGAGGTACTGGACTGAGGGTGGG
TCCCTCAGGAACGTCCCTGTGGGTGGCGGCTCCAGGAAGAACAAGAGACCCTCTTCGTCATTTTTCTTCTTCG
CCATCATCGAAGATCATCAAGCTTCTGATCTGGTGGTGGGCCCCGTCAGTCTTCCCTCAAACCCTAAGACC
CATGAAGCCAACGAGACCTAACTTAACATACCCACCTGATACTACTCCTACTACTGATCAACAAAATCCC
AAGAGTAGCAGTGGAATTATTGCTTCTTCTTCAATGGGATTGAGCTTAAGCTCCTTCATGCCGCACATGCCT
GTAGCATCTGACTCAAGCTCCAACCTTTTATGCGGCCGGTGGCTTGAATTTCCAGCATCTCCTTGGTCTCAA
CCGACGACATCCTCATTCGGTAGTTTTTCTGGACATGGGTTTGAGAGTGGTGGCTTTCTCGGAAGCCTCAA
GGGTTGCAAGAGAGCGGCAATGGTGACGACAGTAATGATGGTGCGAAGCTGTTTTTCTGTTGGAGGATGGT
TTGAAGCATCAAGTGACCAGTACTCCTCGTGTGATGGTCAGTTTGGTCTTCAAAGTAGAGGACAAGGAGAT
CATTCAAATGGGTATTGGAATGGAGTGCTGGGCACTGGAGGATCATGGTGA
```

Sequência da proteína K00405:

>Eucgr.K00405.1

```
MDNAAPSQWTAQGFLGVINNNPPMEIASSPRPVSLSLQEI KPTCGTTTTSRPHKDQALNCPRCSSSNTKFCY
YNNYSLSQPRYFCKTCRRYWTEGGSLRNVPVGGGSRKNKRPFSSSFSSPSSKI IKLPDLVVGPSLQPONPKT
HEAQRDLNLTYPDTPPTDQONPKSSSGI IASSMGLSLSSFMPHPVASDSSSNFYAAGGLNFQHLLGLK
PTTSSFGSFGHGFESGGFLGSLQGLQESNGDDSDNDGAKLFFPVEDGLKHQVTSTPRVDGQFGLQSRGQGD
HSNGYWNGVLGTGGSW*
```

7.2 Mapa do Plasmídeo pXH2FS7

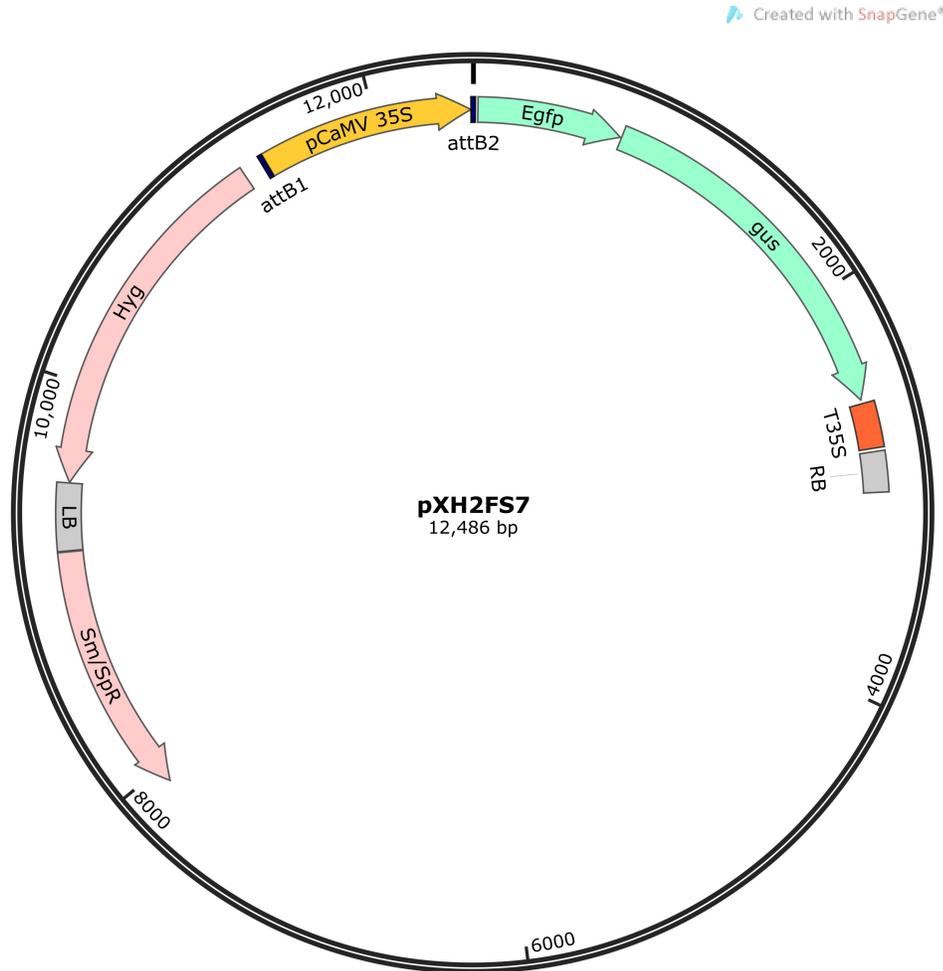


Figura S1. Mapa do vetor pXH2FS7. Imagem gerada pelo programa *SnapGene 2.5* a partir da sequência de nucleotídeos original (VIB). Sítios attB1 e attB2, sequências originárias da recombinação específica pelo sistema *Gateway*; Sm/SpR, gene de resistência aos antibióticos estreptomicina e espectinomicina, o qual possibilita a seleção de bactérias recombinantes; Hyg, gene de resistência ao antibiótico higromicina para seleção de transformantes em plantas; EgfpER, gene que codifica a proteína-repórter GFP) fusionado ao gene-repórter codificador da proteína β -glicuronidase (GUS), sendo expresso sob o controle do promotor 35S e do terminador T35S do CaMV; RB e LB, representam as bordas direita (“right border”) e esquerda (“left border”) do T-DNA (KARIMI *et al.*, 2002).

8. Referências bibliográficas

- AUSUBEL, F. M; BRENT, R; KINGSTON, R. E; MOORE, D. D; SEIDMAN, J. G; SMITH, J. A; STRUHL, K. Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed., John Wiley & Sons, p. 1512, 2002.
- BIMBOIM, H. & DOYLE, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.
- BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. D. C. Manual de Transformação Genética de Plantas. 1º edição. Brasília. EMBRAPA-SPI, 1998.
- CAI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; ZHANG, T.; HU, T.; YE, J.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Genome-wide analysis of plant-specific Dof transcription factor family in tomato. *Journal of Integrative Plant Biology*, v.55, n. 6, p. 552-66, 2013.
- CHEN, H.; AHMAD, M.; RIM, Y.; LUCAS, W. J.; KIM, J. Y. Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *New Phytologist*, v. 198, n. 4, p.1250-60, 2013.
- CIBIO - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. Guia do Eucalipto – Oportunidades para um desenvolvimento sustentável, 2008. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf. Acesso em: Janeiro de 2018.
- CORRALES, A. R.; CARRILLO, L.; LASIERRA, P.; NEBAUER, S. G.; DOMINGUEZ - FIGUEROA, J.; RENU - MORATA, B., POLLMAN, S.; GRANELL, A.; MOLINA, R.V.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; MEDINA, J. Multifaceted role of cycling Dof Factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, v. 40, n.5, p. 748-764, 2017.
- CTNBio 2014 - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: www.ctnbio.gov.br. Acesso em: Janeiro de 2018.
- D'ALMEIDA, G. S. Caracterização da família de fatores de transcrição Dof de *Eucalyptus grandis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. PPGBCM, CBIot, Porto Alegre, 2014.
- DE OLIVEIRA, L. A.; BRETON, M. C.; BASTOLLA, F. M.; CAMARGO, S. D. S.; MARGIS R.; FRAZZON, J.; PASQUALI, G. Reference genes for the normalization of gene expression in Eucalyptus species. *Plant & Cell Physiology*, v. 53, p. 405-422, 2012.

- DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v.19, p. 11-15, 1987.
- DUAN, H. & DING, X. Effects of hygromycin on growth and development of arabidopsis seedling roots. *Pakistan Journal of Botany*, v. 39, n. 6, p. 2167-2173, 2007.
- EE, S. F.; KHAIRUNNISA, M. B.; ZETI-AZURA, M. H.; AZMI, S. N.; ZAMRI, Z. Effective hygromycin concentration for selection of Agrobacterium-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Malaysian Applied Biology*, v. 43, n.1, p. 119-123, 2014.
- GANDOTRA, N.; COUGHLAN, S. J.; NELSON, T. The Arabidopsis leaf provascular cell transcriptome is enriched in genes with roles in vein patterning. *The Plant Journal*, v. 74, n. 1, p. 48-58, 2013.
- GARDINER, J.; SHERR, I.; SCARPELLA, E. Expression of DOF genes identifies early stages of vascular development in Arabidopsis leaves. *International Journal of Developmental Biology*, v. 54, n. 8-9, p.1389-1396, 2010.
- GHAZALA, W.; WALTERMANN, A.; PILOT, R.; WINTER, S.; VARRELMANN, M. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *Journal of general virology*, v. 89, n. 7, p. 1748-1758, 2008.
- GUO, Y.; QIN, G.; GU, H.; QU, L. J. Dof5.6/HCA2, a Dof transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, v. 21, n. 11, p. 3518-3534, 2009.
- ENCE, S.A. – GRUPO EMPRESARIAL. Sustainable forest management and *Eucalyptus*, 2009.
- GOPAL, G. J. & KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. *The protein journal*, v. 32, n.6, p. 419-425, 2013.
- GUPTA, A. J.; HALDAR, S.; MILIČIĆ, G.; HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Active cage mechanism of chaperonin-assisted protein folding demonstrated at single-molecule level. *Journal of molecular biology*, v. 426, n.15, p. 2739-2754, 2014.
- GUPTA, S.; MALVIYA, N.; KUSHWAHA, H.; NASIM, J.; BISHT, N. C.; SINGH, V. K.; YADAV, D. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta*, v. 241, n. 3, p. 549-562, 2015.
- GUO, Y. & QIU, L. J. Genome-wide analysis of the Dof transcription factor gene family reveals soybean-specific duplicable and functional characteristics. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e76809, 2013.

- HARPER, S. & SPEICHER, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. In *Protein Chromatography*. Humana Press, p. 259-280, 2011.
- HARRISON, S. J.; MOTT, E. K.; PARSLEY, K.; ASPINALL, S.; GRAY, J. C.; COTTAGE, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods*, v. 2, n. 1, p.19, 2006.
- IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. Disponível em: www.iba.org/pt/. Acesso em: Janeiro de 2018.
- JENNINGS, M. J.; BARRIOS, A. F.; TAN, S. Elimination of truncated recombinant protein expressed in *Escherichia coli* by removing cryptic translation initiation site. *Protein Expression and Purification*, v. 121, p. 17-21, 2016.
- JONES, D. & SCHOFIELD, J. P. A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic acids research*, v. 18, n. 24, p. 7463, 1990.
- KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. Gateway™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 193-195, 2002.
- KARIMI, M.; DEPICKER, A.; HILSON, P. Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology*, v. 145, p. 1144-1154, 2007.
- KISU, Y.; ONO, T.; SHIMOFURUTANI, N.; SUZUKI, M.; ESAKA, M. Characterization and expression of a new class of zinc finger protein that binds to silencer region of ascorbate oxidase gene. *Plant & Cell Physiology*, v. 39, p. 1054–1064, 1998.
- KOKKIRALA, V. R.; YONGGANG, P.; ABBAGANI, S.; ZHU, Z.; UMATE, P. Subcellular localization of proteins of *Oryza sativa* L. in the model tobacco and tomato plants. *Plant signaling & behavior*, v. 5, n. 11, p. 1336-1341, 2010.
- KOORNNEEF, M. & MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, v. 61, n. 6, p. 909-921, 2010.
- KONISHI, M. & YANAGISAWA, S. Sequential activation of two Dof transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, p. 623–629, 2007.
- KUSHWAHA, H.; GUPTA, S.; SINGH, V. K.; RASTOGI, S.; YADAV, D. Genome wide identification of Dof transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*. *Molecular Biology Reports*, v. 38, n. 8, p. 5037-5053, 2011.

KREBS, J.; MUELLER-ROEBER, B.; RUZICIC, S. A novel bipartite nuclear localization signal with an atypically long linker in DOF transcription factors. *Journal of plant physiology*, v. 167, n. 7, p. 583-586, 2010.

LE HIR, R. & BELLINI, C. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 164, 2013.

LERAYER, A. Guia do Eucalipto 2009. Disponível em: www.cib.org.br. Acesso em: outubro de 2010.

LIJAVETZKY, D.; CARBONERO, P.; VICENTE-CARBAJOSA, J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and Arabidopsis Dof gene families. *BMC Evolutionary Biology*, v. 3, p. 17, 2003.

MÄHÖNEN, A. P.; BONKE, M.; KAUPPINEN, L.; RIIKONEN, M.; BENFEY, P. N.; HELARIUTTA, Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root. *Genes & development*, v. 14, n. 23, p. 2938-2943, 2000.

MÄHÖNEN, A. P.; HIGUCHI, M.; TÖRMÄKANGAS, K.; MIYAWAKI, K.; PISCHKE, M. S.; SUSSMAN, M. R.; HELARIUTTA, Y.; KAKIMOTO, T. Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in Arabidopsis. *Current Biology*, v.16, n.11, p.1116-1122, 2006.

MALEK, J. A.; SHATSMAN, S. Y.; AKINRETOYE, B. A.; GILL, J. E. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *BioTechniques*, v. 29, n. 2, p. 252-256, 2000.

MCINERNEY, P.; ADAMS, P.; HADI, M. Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Molecular biology international*, v. 2014, 2014.

MCNALLY, K. L.; BRUSKIEWICH, R.; MACKILL, D.; BUELL, C. R.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Sequencing multiple and diverse rice varieties. Connecting whole-genome variation with phenotypes. *Plant Physiology*, v.141, n.1, p. 26-31, 2006.

MERCENARO, L.; NIEDDU, G.; PORCEDDU, A.; PEZZOTTI, M.; CAMIOLO, S. Sequence polymorphisms and structural variations among four grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars representing Sardinian agriculture. *Frontiers in plant science*, v. 8, p. 1279, 2017.

MOGK, A.; MAYER, M. P.; DEUERLING, E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem*, v. 3, n. 9, p. 807-814, 2002.

- MOKFIENSKI, A. & COLODETTE, J. Relative importance of wood density and carbohydrate content on pulping yield and product quality. *Ciência Florestal*, v. 18, p. 401–413, 2008.
- MORA, A. L. & GARCIA, C. H. A cultura do eucalipto no Brasil. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo, SP. 2000.
- MORENO-RISUENO, M.A.; MARTÍNEZ, M.; VICENTE-CARBAJOSA, J.; CARBONERO, P. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 277, p. 379–390, 2007.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAKABAYASHI, K.; BARTSCH, M.; DING, J.; SOPPE, W. J. Seed dormancy in Arabidopsis requires self-binding ability of DOG1 protein and the presence of multiple isoforms generated by alternative splicing. *PLoS genetics*, v. 11, n. 12, p. e1005737, 2015.
- NIEMINEN, K.; IMMANEN, J.; LAXELL, M.; KAUPPINEN, L.; TARKOWSKI, P.; DOLEZAL, K.; TAHTIHARJU, S.; ELOA, A.; DECOURTEIXA, M.; LJUNG, K.; BHALERAOD, R.; KEINONEN, K.; ALBERT, V. A.; HELARIUTTAA, Y. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 105, n. 50, p. 20032-20037, 2008.
- PAPI, M.; SABATINI, S.; BOUCHEZ, D.; CAMILLERI, C.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. *Genes & Development*, v. 14, n.1, p. 28–33, 2000.
- PALMER, E. & FREEMAN, T. Investigation into the use of C-and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. *Comparative and Functional Genomics*, v. 5, n. 4, p. 342-353, 2004.
- PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; & STOKES, A. Wood formation in trees. *Plant physiology*, v. 127, n. 4, p. 1513-1523, 2001.
- POTAPOV, V. & ONG, J. L. Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PloS One*, v. 12, n. 1, p. e0169774, 2017.
- RENGEL, D.; SAN CLEMENTE, H.; SERVANT, F.; LADOUCE, N.; PAUX, E.; WINCKER, P.; COULOUX, A.; SIVADON, P.; GRIMA-PETTENATI, J. A new genomic resource dedicated to wood formation in *Eucalyptus*. *BMC Plant Biology*, v. 9, n. 1, p. 36, 2009.

ROGERS, L. A.; DUBOS, C.; SURMAN, C.; WILLMENT, J.; CULLIS, I. F.; MANSFIELD, S. D.; CAMPBELL, M. M. Comparison of lignin deposition in three ectopic lignification mutants. *New Phytologist*, v. 168, n. 1, p. 123-140, 2005.

ROSANO, G. L. & CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172, 2014.

SANTOPOLO, S.; BOCCACCINI, A.; LORRAI, R.; RUTA, V.; CAPAUTO, D.; MINUTELLO, E.; SERINO, G.; COSTANTINO, P.; VITTORIOSO, P. DOF AFFECTING GERMINATION 2 is a positive regulator of light-mediated seed germination and is repressed by DOF AFFECTING GERMINATION 1. *BMC Plant Biology*, v. 15, n.1, p. 72, 2015.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. *Ciência Rural*, v. 38, p. 861-871, 2008.

SHAW, L. M.; MCINTYRE, C. L.; GRESSHOFF, P. M.; XUE, G. P. Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation. *Functional & Integrative Genomics*, v. 9, n. 4, p. 485, 2009.

SKIRYCH, A.; REICHEL, M.; BUROW, M.; BIRKEMEYER, C.; ROLCIK, J.; KOPKA, ZANOR, M. I.; GERSHENZON, J.; STRNAD, M.; SZOPA, J.; MUELLER-ROEBER, B. DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, v. 47, n.1, p. 10-24, 2006.

SPARKES, I. A.; RUNIONS, J.; KEARNS, A.; HAWES, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, v. 1, n. 4, p. 2019, 2006.

SPICER, R. & GROOVER, A. Evolution of development of vascular cambium and secondary growth. *New Phytologist*, v. 186, n. 3, p. 577-592, 2010.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

TANZ, S. K.; CASTLEDEN, I.; SMALL, I. D.; MILLAR, A. H. Fluorescent protein tagging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 214, 2013.

UMEMURA, Y.; ISHIDUKA, T.; YAMAMOTO, R.; ESAKA, M. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as Cys2/Cys2 Zn finger domain. *The Plant Journal* v. 37, p. 741-749, 2004.

VIDAL, R. O.; NASCIMENTO, L. C. D.; MAURÍCIO COSTA MONDEGO, J.; AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA, G.; FALSARELLA CARAZZOLLE, M. Identification of SNPs in RNA-seq data of two cultivars of *Glycine max* (soybean) differing in drought resistance. *Genetics and Molecular Biology*, v. 35, n.1, p. 331-334, 2012.

WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science*, v. 80, p.6.1.1-35, 2015.

YANAGISAWA, S. The transcriptional activation domain of the plant-specific Dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. *Plant and Cell Physiology*, v. 42, n. 8, p. 813-822, 2001.

YANAGISAWA, S. Dof domain proteins: plant-specific transcription factors associated with diverse phenomena unique to plants. *Plant & Cell Physiology*, v. 45, p. 386–391, 2004.

YANAGISAWA, S., SCHMIDT, R. J. Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *The Plant Journal* v. 17, p. 209–214, 1999.

YANAGISAWA, S.; SHEEN J. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *The Plant Cell* v.10, n.1, p.75–89, 1998.

YANG, X. & TUSKAN, G. A. Divergence of the Dof gene families in poplar, Arabidopsis, and rice suggests multiple modes of gene evolution after duplication. *Plant Physiology*, v. 142, n. 3, p. 820-830, 2006.

YE, Z. H. & ZHONG, R. Molecular control of wood formation in trees. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 4119-4131, 2015.

YOO, S. D.; CHO, Y. H.; SHEEN, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, v. 2, n.7, p.1565, 2007.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, v. 7, n. 5, p.620-634, 2012.

ZHAN, Y.; SONG, X.; ZHOU, G. W. Structural analysis of regulatory protein domains using GST-fusion proteins. *Gene*, v. 281, n.1, p. 1-9, 2001.

ZHANG, X.; HENRIQUES, R.; LIN, S. S.; NIU, Q. W.; CHUA, N. H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, v.1, p. 641-646, 2006.

ZHANG, J.; ELO, A. & HELARIUTTA, Y. Arabidopsis as a model for wood formation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 2, p. 293-299, 2011.

ZHANG, J.; NIEMINEN, K.; SERRA, J. A. A.; HELARIUTTA, Y. The formation of wood and its control. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 17, p. 56-63, 2014.

9. Curriculum Vitae

MARQUES, R.

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Raíssa Volpatto Marques

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 16 de dezembro de 1992

E-mail: rai_vol@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

Curso de graduação

Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de março de 2011 à dezembro de 2015.

Graduação sanduíche, University of Kentucky, EUA, de janeiro de 2014 à dezembro de 2014.

Curso de pós-graduação *Stricto Sensu* (Mestrado)

Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de março de 2016 à março de 2018.

3. ESTÁGIOS:

Bolsista PIBIC (CNPq)

Estudo genético de *Cunila fasciculata Benth* (Lamiaceae)

Orientação: Dra. Eliane Kaltchuck dos Santos

Local: UFRGS – Laboratório de Sistemática Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências

Período: março de 2012 à março de 2013

Bolsista CNPq

Expressão da glicocerebrosidase humana (HsGBA) em plantas

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Local: UFRGS- Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia

Período: abril de 2013 à maio de 2013

Estágio Voluntário

Caracterização da diversidade genética de feijões da região de montanhas do Appalachian em Kentucky por marcadores RAPD.

Orientação: Dra. Lisa Vaillancourt

Local: University of Kentucky

Período: janeiro de 2014 à abril de 2014 e agosto de 2014 à dezembro de 2014

Estágio Voluntário

Genotipagem e fenotipagem de plantas transgênicas tolerantes a estresses.

Orientação: Dr. Eduardo Blumwald.

Local: University of California- Davis (UCDavis).

Período: maio de 2014 à julho de 2014

Bolsista CAPES

Método de detecção e caracterização de transgenes inseridos em *Eucalyptus* geneticamente modificados.

Orientação: Dr. Giancarlo Pasquali

Local: UFRGS- Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia

Período: março de 2015 à dezembro de 2015