



Genes de Lignificação

Em busca do eucalipto transgênico com reduzidos teores de ligninas

Débora Vom Endt,

M.Sc. em Genética e Biologia Molecular, UFRGS

Patrícia Costa,

Bacharel em Ciências Biológicas, UFRGS

Marcelo Kemel Zago,

Bacharel em Ciências Biológicas, UFRGS

Maria Helena Bodanese Zanettini,

Ph.D., Professora Titular do Depto. de Genética,

Instituto de Biociências, UFRGS

Giancarlo Pasquali,

Ph.D., Professor Adjunto do Depto. de Biologia

Molecular e Biotecnologia, Instituto de

Biociências e Pesquisador do Centro de

Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul,

UFRGS.

pasquali@dna.cbiot.ufrgs.br

Fotos cedidas pelos autores

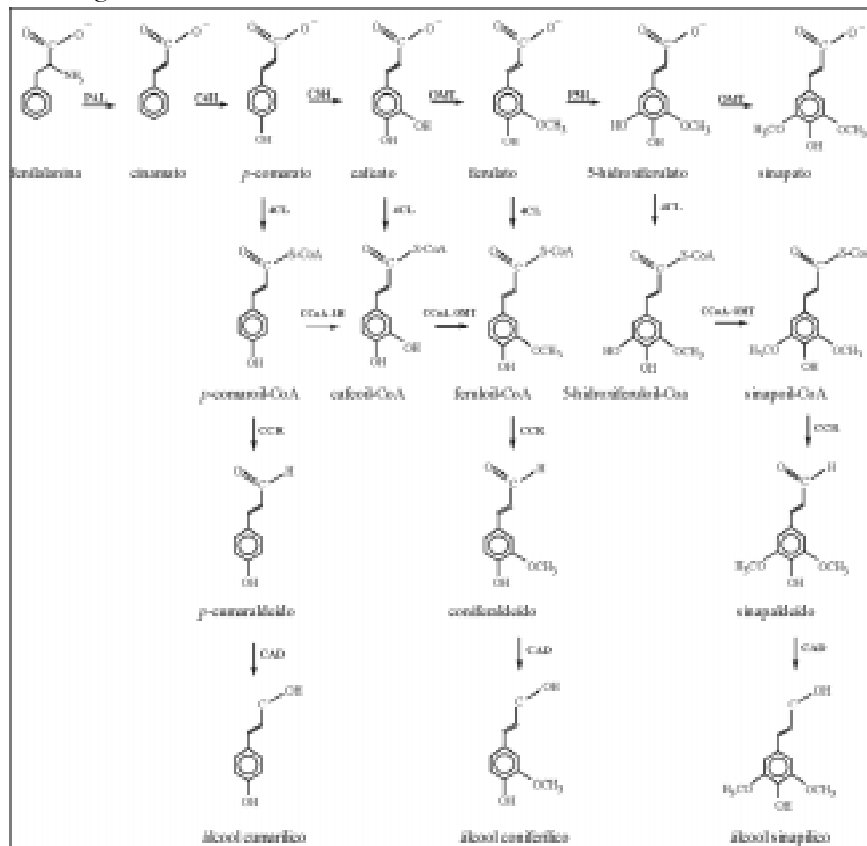
A lignificação é um processo altamente regulado decorrente da biossíntese das ligninas, componentes intrínsecos da parede celular secundária de vegetais superiores. Respondendo por 25 a 30% da biomassa terrestre, as ligninas representam o segundo mais abundante biopolímero do planeta, sendo superadas apenas pela celulose. Trata-se de

polímeros vegetais derivados dos álcoois hidroxicinâmicos *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, também chamados de monolignóis. Funcionalmente, a rigidez e a hidrofobia dos polímeros de lignina são importantes para o suporte mecânico, característica que provavelmente permitiu a melhor adaptação das plantas à vida terrestre (MONTIES, 1989), a condução de água (NORTHCOTE, 1989) e a defesa vegetal ao ataque de patógenos (VANCE *et al.*, 1980). Além disso, as ligninas parecem exercer um importante papel na ancoragem e sustentação de polissacarídeos da parede celular durante a deposição dos mesmos, como foi demonstrado pela inibição de enzimas envolvidas na lignificação (NAKASHIMA *et al.*, 1997).

Do ponto de vista econômico, a presença de altos teores de ligninas em vegetais representa maior custo de produção ou baixa produtividade. Na obtenção da polpa de celulose e papel a partir da madeira, por exemplo, a lignina deve ser removida por meio de um tratamento químico severo, que é oneroso tanto em termos financeiros quanto ambientais. Na pecuária, os altos teores de ligninas em plantas forrageiras determinam uma baixa digestibilidade, caracterizando pastagens de baixa qualidade.

Visando a melhor compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos na biossíntese das ligninas, vários trabalhos têm buscado a caracterização de enzimas e genes envolvidos nessa rota metabólica. Esses estudos têm permitido a alteração do processo de lignificação por meio, por exemplo, da modulação da atividade enzimática pela inibição química (LAUVERGEAT *et al.*, 1995) ou pela expres-

Figura 1 – Biossíntese dos monolignóis. PAL: fenilalanina amônia-liase, C4H: cinamato hidroxilase, C3H: coumarato hidroxilase, OMT: *o*-metiltransferase, F5H: ferulato hidroxilase, 4CL: 4-hidroxicinamato-CoA ligase, CCR: cinamoil-CoA redutase, CAD: álcool cinâmílico desidrogenase.



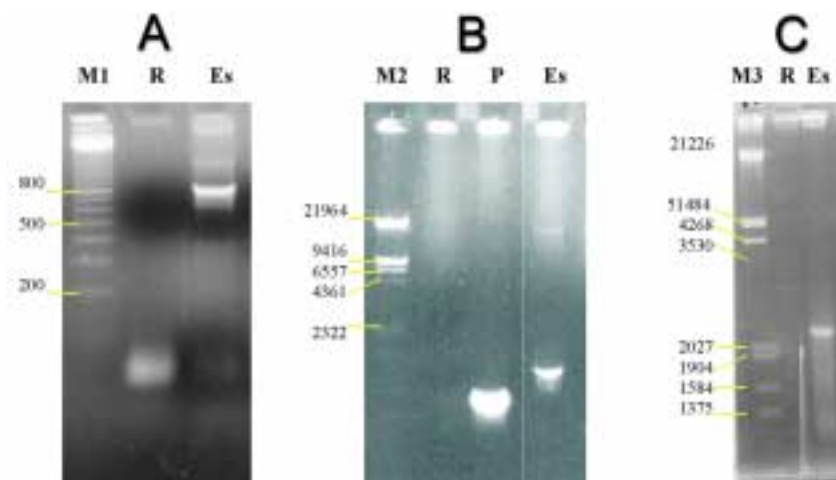


Figura 2 – Resultados das amplificações de fragmentos de *cad* de *E. saligna* com diferentes combinações de *primers*.

As fotografias reproduzem os géis de agarose contendo os produtos de amplificação a partir de PCRs de DNA genômico de *E. saligna* (Es). Como controles negativos foram utilizadas as misturas de reações (R) sem DNA-molde; [A] Amplificação do fragmento de *cad* de 0,8 kb com os *primers* CADFOR (5'-GGGGCTTGGAGGGGTTGG-3') e 3'ENDCAD (5'-CTAATCAAGCTTGCTTCCC/AGCA/GACGTCC-3'). Padrão "100 bp ladder" de fragmentos de DNA em pb (M1); [B] Amplificação do fragmento de *cad* de 1,4 kb com os *primers* 5'ENDCAD (5'-AAGCTTGGATCTTTGAGCAAAAATGGGC-3') e CADREV (5'-CCAACCCCTCCAAGCCCC-3'). Padrão de fragmentos de DNA de fago λ gerados por restrição com *Hind*III, em pb (M2). Controle positivo da reação constituído de plasmídeo contendo cDNA para CAD de *E. gunnii* (P); [C] Amplificação do fragmento de *cad* de 2,3 kb com os *primers* 5'ENDCAD e 3'ENDCAD. Padrão de fragmentos de DNA de fago λ gerados por restrição com *Eco*RI/*Hind*III, em pb (M3). As PCRs foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em um volume final de reação de 100 μ l; Cada reação foi conduzida com 150 ng de DNA-molde, 200 μ M de dNTP's, 300 ng de cada *primer*, 5 U de Taq DNA Polimerase (GENBIOT Enzimas) e 2 mM de $MgCl_2$. As condições de termociclagem foram as seguintes: desnaturação inicial de 3 min a 94°C seguida de 6 ciclos de amplificação com redução em 2°C na temperatura de anelamento a cada ciclo (67°C \rightarrow 57°C), seguidos de 35 ciclos de [30 s a 94°C + 1 min a 57°C + 2 min a 72°C] e, finalmente, um período de 5 min a 72°C para síntese final.

	<i>A. thaliana</i>	<i>E. botryoides</i>	<i>E. gunnii</i>	<i>E. saligna</i>
<i>A. thaliana</i>	100,00	69,85	70,11	69,83
<i>E. botryoides</i>		100,00	97,41	98,35
<i>E. gunnii</i>			100,00	97,50
<i>E. saligna</i>				100,00

Tabela 1 – Comparação entre as seqüências nucleotídicas de genes *cad* (% de identidade). Os resultados foram obtidos através de análise realizada com o comando "Bestfit" do GCG (1997), utilizando os parâmetros padrões pré-definidos pelo programa. Os números de acesso nos bancos de dados para os genes *cad* de *A. thaliana*, *E. botryoides* e *E. gunnii* são, respectivamente, Z31715, D16624 e X75480.

são dos genes em orientação reversa ou antisense (HALPIN *et al.*, 1994; HIBINO *et al.*, 1995; BAUCHER *et al.*, 1996). O entendimento e a manipulação dos elementos envolvidos na regulação desses genes possibilitará a obtenção de plantas (arbóreas e forrageiras) com teores de ligninas mais adequados aos diversos fins industriais ou à pecuária.

Enquanto as etapas enzimáticas e os substratos envolvidos na biossíntese dos precursores primários das ligninas estão relativamente bem caracterizados, pouco se sabe a respeito da formação do polímero de lignina *per se*, sua estrutura *in situ* e sua biodegradação. A formação de monolignóis representa um dos principais ramos da rota metabólica do chiquimato/corimato, uma vez que grandes quantidades do material vascular vegetal são derivadas de fenilpropanóides (Figura 1). Além dos monolignóis, diversas classes de compostos derivam, em menor proporção, da mesma rota biossintetizante geral de fenilpropanóides, principalmente flavonóides, isoflavonóides, furanocoumarinas, fenóis simples, ácidos e álcoois coniferílicos glicosilados. Essas substâncias possuem funções de defesa (fitoalexinas e protetores à luz ultravioleta), ecológicas (pigmentos e fragrâncias) e de reguladores do crescimento (DIXON & LAMB, 1990).

Vários trabalhos têm descrito o isolamento e a caracterização de genes codificadores de enzimas envolvidas na rota de biossíntese das ligninas. O estudo da regulação gênica e enzimática em etapas iniciais da conversão do aminoácido precursor fenilalanina (enzimas PAL e 4-CL) encontra-se em estado avançado, servindo de paradigma ao entendimento da regulação do metabolismo secundário em plantas. Vários trabalhos demonstraram que a transcrição desses genes é positiva, rápida e coordenadamente regulada em situações de estresse como o tratamento com indutores (*elicitors*) fúngicos ou luz ultravioleta (revisado em BOUDET *et al.*, 1996). O estudo dos processos que regulam a expressão de genes participantes das etapas finais da síntese de monolignóis, no entanto, está nos estágios iniciais, mas é possível que, da mesma forma, haja uma regulação coordenada da

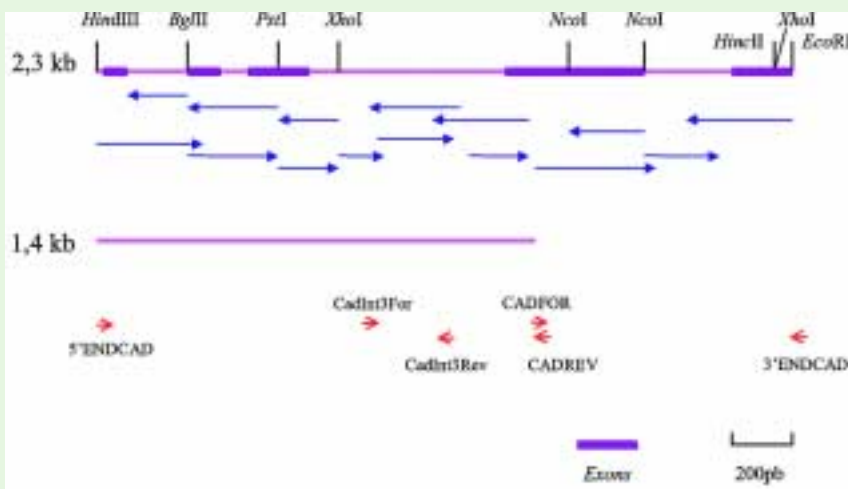


Figura 3 – Mapa físico e estratégia de seqüenciamento dos fragmentos do gene *cad* de *E. saligna*.

Os sítios de *HindIII* e *EcoRI* estão situados no vetor pBluescript SK⁺ (Stratagene). As setas azuis indicam a direção e extensão dos seqüenciamentos. As setas vermelhas indicam a posição e orientação dos *primers*. As barras maiores (cor de rosa) correspondem aos fragmentos de 2,3 e 1,4 kb clonados. As barras púrpuras representam os *exons* do gene.

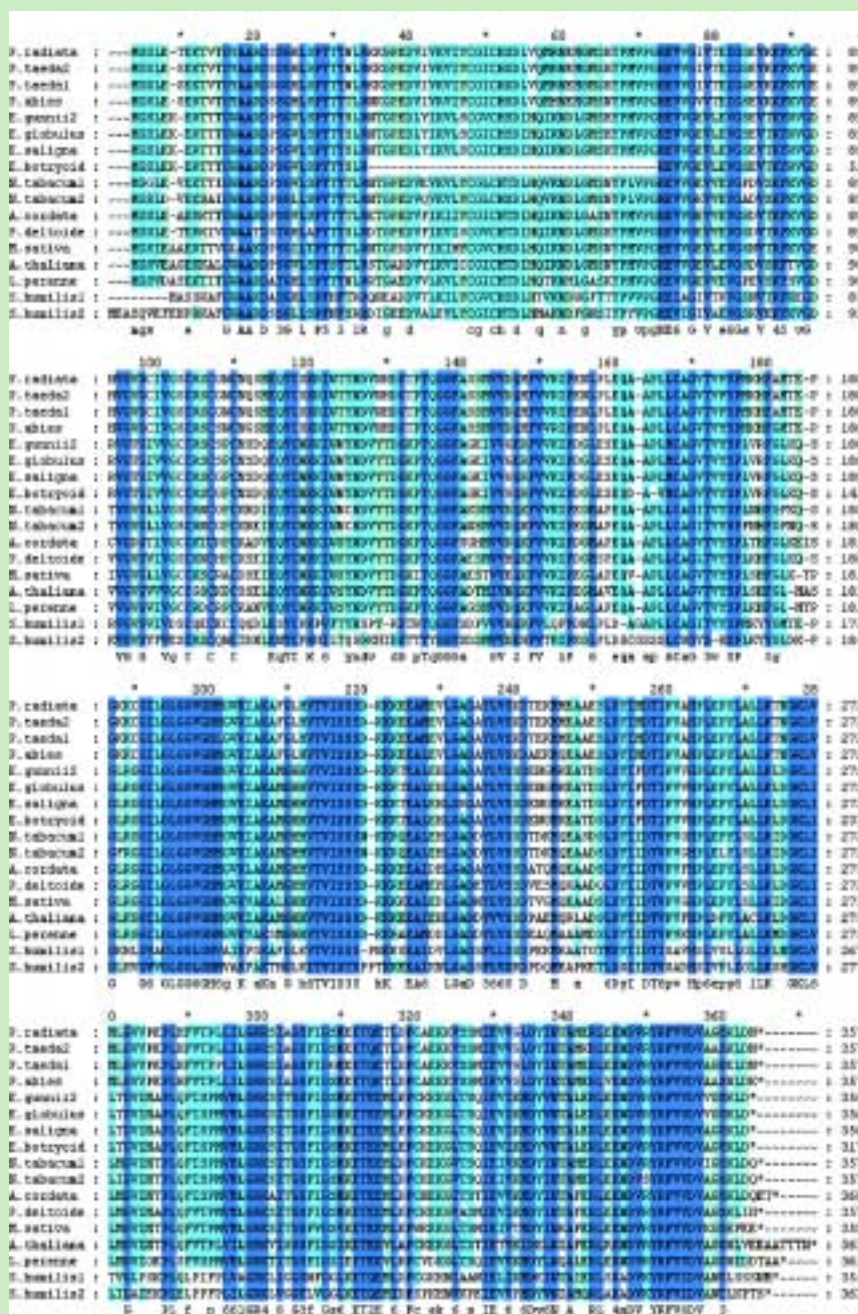


Figura 4 – Alinhamento de seqüências de aminoácidos aferidas a partir de seqüências do gene *cad* disponíveis.

O alinhamento foi realizado através do comando "PileUp" do programa GCG (1997), utilizando parâmetros padrões pré-determinados. Os códigos de acesso às seqüências nucleotídicas estão indicados na legenda da Tabela 2. A seqüência indicada nas linhas inferiores às comparações representa o consenso entre elas.

expressão para estes.

Visando melhor compreender os mecanismos de regulação gênica envolvidos na síntese de ligninas em plantas, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar o gene codificador da enzima álcool cinâmico desidrogenase (CAD) de *E. saligna*, uma das espécies arbóreas de maior importância na região sul do Brasil para a produção de celulose e papel. Com o objetivo de gerar plantas transgênicas de *Eucalyptus* com teores de ligninas reduzidos, ensaios de transformação genética foram, igualmente, conduzidos com *E. saligna* e *E. dunnii*, outra espécie de grande importância para o sul do Brasil.

O gene *cad* de *Eucalyptus saligna*

A estratégia utilizada para isolar as seqüências nucleotídicas codifi-

	A.cor	A.thal	E. Botr	E. gu1	E. gu2	E. glob	L. pere	M. sati	N. tab1	N. tab2	P. abie	P. delt	P. radi	P. tael	P. tae2	S. hu1	S. hu2	E. sali
A.cor	100	78	71	12	80	80	78	79	83	80	69	83	68	67	67	50	47	80
A.thal		100	64	12	73	73	74	75	74	73	65	76	64	63	64	47	45	73
E.botr			100	12	87	87	66	67	71	69	60	70	60	59	59	42	39	88
E.gu1				100	13	13	12	13	12	13	13	12	13	13	13	13	12	13
E.gu2					100	99	74	77	80	77	68	80	67	66	67	48	45	98
E.glob						100	74	77	89	77	68	80	68	67	67	48	45	98
L.pere							100	73	76	74	66	75	67	66	66	47	47	74
M.sati								100	79	77	67	79	66	65	66	48	45	76
N.tab1									100	94	69	81	69	68	69	48	47	80
N.tab2										100	69	79	69	68	69	49	47	78
P.abie											100	69	94	94	94	51	48	68
P.delt												100	70	68	69	50	47	80
P.radi													100	98	99	51	48	68
P.tae1														100	98	52	48	67
P.tae2															100	51	48	67
S.hu1																100	55	48
S.hu2																	100	45
E.sali																		100

Tabela 2 – Percentual de identidade de resíduos de aminoácidos de diferentes proteínas CAD inferidos a partir de seqüências disponíveis nos bancos EMBL e GenBank. Os valores de identidade foram obtidos a partir do alinhamento das seqüências através do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Os números de acesso no GenBank e EMBL às seqüências estão indicados a seguir. A.cor (*A. cordata*, D13991, HIBINO *et al.*, 1993); A.thali (*A. thaliana*, L37884); E.botr (*E. botryoides*, D16624); E.gu1 (*E. gunnii* 1, X88797, GRIMA-PETTEMATI *et al.*, 1993); E.gu2 (*E. gunnii* 2, X65631, GRIMA-PETTEMATI *et al.*, 1993); E.glob (*E. globulus*, AF038561); L.pere (*L. perenne*, AF010290); M.sati (*M. sativa*, Z19573, VAN DOORSSELAERE, *et al.*, 1995); N.tab1 (*N. tabacum* 1, X62343, KNIGHT *et al.*, 1992); N.tab2 (*N. tabacum*2, X62344, KNIGHT *et al.*, 1992); P.abie (*P. abies*, X72675, GALLIANO *et al.*, 1993); P.delt (*P. deltooides*, Z19568); P.radi (*P. radiata*, U62394); P.tae1 (*P. taeda*1, Z37991, O'MALLEY *et al.*, 1992); P.tae2 (*P. taeda*2, Z37992, O'MALLEY *et al.*, 1992); S.hu1 (*S. humilis*1, L36823); S.hu2 (*S. humilis*2, L36456). Os valores de identidade foram obtidos a partir do alinhamento das seqüências por meio do programa ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994).

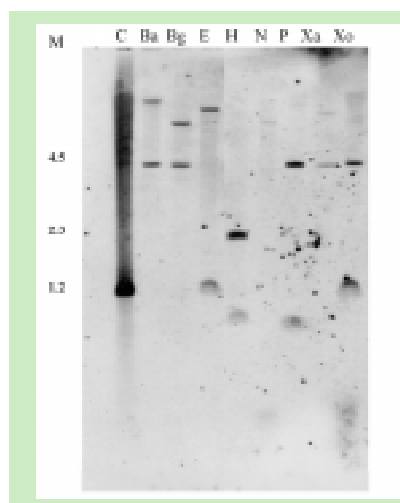


Figura 5 – Southern blot de DNA genômico de *E. saligna* hibridizado com uma sonda correspondente ao quarto exon do gene *cad* de *E. gunnii*. O fragmento de DNA utilizado como sonda possui 256 pb e foi excisado de pEuCAD2 (Grima-Pettenati *et al.*, 1993) com *Nco*I. Os números indicam tamanhos de fragmentos padrões de DNA em kb. Ba = *Bam*HI, Bg = *Bgl*II, E = *Eco*RI, H = *Hind*III, N = *Nco*I, P = *Pst*I, Xa = *Xba*I, Xo = *Xho*I, C = cDNA de *E. gunnii*.

cadoras da enzima CAD foi a direta amplificação destas pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) a partir de DNA genômico de *E. saligna*. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) confeccionados a partir da análise de seqüências conservadas dos genes *cad* disponíveis (GenBank e EMBL, referências e códigos de acesso indicados na Tabela 2), três fragmentos de DNA foram amplifica-

dos, clonados e analisados por mapeamento e seqüenciamento (Figuras 2 e 3). Os fragmentos de 1,4 kb, correspondente à porção 5'-terminal do gene, e de 0,8 kb, correspondente à porção 3'-terminal, estão contidos no fragmento de 2,3 kb. Por tratar-se do fragmento mais completo, este último foi utilizado para subclonagens e seqüenciamento. Conforme ilustrado na Figura 3, a análise da seqüência nucle-

otídica do gene *cad* de *E. saligna* revelou a presença de cinco exons. A comparação de *cad* de *E. saligna* com as outras seqüências genômicas já isoladas, provenientes de *Arabidopsis thaliana* (BAUCHER *et al.*, 1995), *E. gunnii* (FEUILLET *et al.*, 1995) e *E. botryoides* (HIBINO *et al.*, 1994), demonstrou alta identidade entre elas (Tabela 1), sendo bastante conservada entre as espécies de *Eucalyptus* (97% de identidade entre nucleotídeos).

Seqüências de cDNAs de *cad* foram isoladas de mais de 12 espécies vegetais. A comparação das seqüências peptídicas CAD deduzidas a partir destas seqüências nucleotídicas (Figura 4 e Tabela 2) revelou uma identidade de 98% entre a enzima de *E. saligna* e as seqüências descritas para *E. gunnii* e *E. globulus*, e de 88% com a seqüência de *E. botryoides*. Este último valor foi provavelmente subestimado em função da falta do segundo exon da seqüência *cad* de *E. botryoides*, observável no alinhamento. O notável grau de conservação das pro

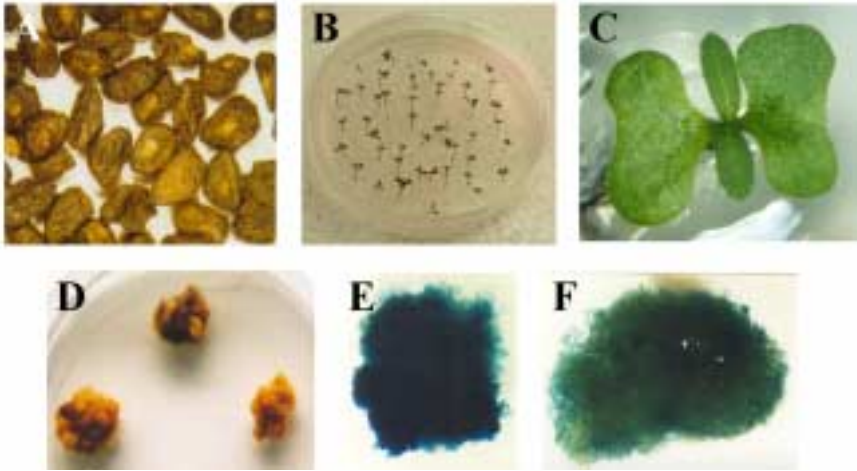


Figura 6 – Transformação genética de tecidos de *Eucalyptus saligna* e *E. dunnii* via *Agrobacterium tumefaciens*. A. Sementes de *E. saligna*; B. Plântulas de 10 dias de *E. saligna* germinadas *in vitro*. C. Cotilédones de *E. saligna* utilizados nos ensaios de transformação genética. D. Calos de *E. saligna* induzidos em meio seletivo após a infecção com *A. tumefaciens*; E. Ensaio histoquímico de GUS em calos derivados de cotilédones de *E. saligna* e (F.) *E. dunnii* infectados com *A. tumefaciens* LBA4404::pTOK233.

teínas CAD alinhadas permite inferir que resultados de análises de elementos estruturais desta proteína determinados em outros organismos, sejam válidos, também, para a CAD de *E. saligna*. A identidade dos clones de cDNA provenientes de *E. gunnii* e *Picea abies* foram comprovadas bioquimicamente pela produção de proteínas CAD funcionais (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993; GALLIANO *et al.*, 1993). A homologia de 98% apresentada entre a seqüência de aminoácidos deduzida do gene *cad* isolado de *E. saligna* com os resíduos de aminoácidos inferidos para a seqüência *cad* de *E. gunnii* confirma, assim, a verdadeira identidade do clone obtido.

A presença de duas cópias gênicas codificadoras de CAD no genoma de *E. saligna* foi definida a partir da análise de hibridização de *Southern blot*, onde duas bandas foram observadas para cada amostra de DNA tratada com endonucleases (Figura 5). Neste experimento, foi utilizado como sonda um fragmento correspondente ao quarto exon do gene *cad* de *E. gunnii* (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993). Apesar deste fragmento ser proveniente de outra espécie de *Eucalyptus*, o seqüenciamento comprovou que ele apresenta apenas 3 nucleotídeos diferentes em relação à mesma porção do gene em *E. saligna*

(resultado não apresentado, VOM ENDT, 1999). Análises semelhantes realizadas para diferentes espécies vegetais têm revelado, sem exceção, um pequeno número de bandas de hibridização. Para *cad* de *E. gunnii* (GRIMA-PETTENATI *et al.*, 1993) e *P. taeda* (MACKAY *et al.*, 1995), foi sugerido que apenas uma cópia do gene esteja presente, e duas cópias foram descritas para *Aralia cordata* (HIBINO *et al.*, 1993) e *N. tabacum* (KNIGHT *et al.*, 1992). O fato de os três fragmentos de *cad*, independentemente amplificados a partir do DNA de *E. saligna*, apresentarem seqüências nucleotídicas idênticas (resultados não apresentados) revelou que todos são possivelmente provenientes da mesma cópia do gene. Provavelmente existam diferenças entre as duas cópias nas regiões de anelamento dos *primers* utilizados nas PCRs.

A análise da expressão do gene *cad* de *E. saligna* foi realizada pela hibridização de *Northern blots* contendo RNAs extraídos de folhas, caules e raízes, e de plântulas inteiras não tratadas ou mantidas durante 16 horas em água ou em solução de extrato de leveduras ou 2,4-D (resultados não apresentados, VOM ENDT, 1999). A detecção de RNA para CAD foi possível apenas em amostras isoladas de plântulas tratadas com extrato de leveduras.

O extrato de leveduras funciona como um agente sinalizador ou indutor de estresse (*elicitor*), mimetizando uma situação de infecção da planta por fungos. O envolvimento das ligninas e de alguns de seus genes e enzimas biossintetizantes na defesa vegetal tem sido relatado para diferentes espécies vegetais, particularmente para PAL e 4CL (DIXON & LAMB, 1990; revisado em BOUDET *et al.*, 1996). GALLIANO *et al.* (1993) descreveram que o tratamento de plântulas de *P. abies* com ozônio, um *elicitor* abiótico, e com filtrados de culturas de *Rhizosphaera kalkhoffii*, induzem um aumento significativo da expressão de *cad*. Mais recentemente, LONGEMANN *et al.* (1997) sugeriram, inclusive, a existência de uma proteína CAD especificamente expressa em resposta a situações de estresse em *P. crispum*. O comportamento do gene *cad* de *E. saligna*, conforme os resultados obtidos, indica que este esteja também associado à defesa vegetal, embora não se possa desconsiderar o seu papel na biossíntese de ligninas estruturais ou constitutivas.

Transformação genética de *Eucalyptus*

Com o intuito de definir um método eficiente para a obtenção de plantas transgênicas de *E. saligna* e *E. dunnii*, diversas combinações de reguladores de crescimento e condições de cultivo de tecidos *in vitro* foram testadas. Em nossos laboratórios, calos friáveis, claros e de rápido crescimento foram obtidos a partir de cotilédones de plântulas de *E. saligna* germinadas *in vitro* (Figura 6) e mantidos em meio MS completo (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo a combinação de 3,5 mg.l⁻¹ de NAA e 0,05 mg.l⁻¹ de quinetina, a 26±2°C e na total ausência de luz (COSTA, 1999). Utilizando o mesmo explante para *E. dunnii*, as melhores condições de cultivo combinaram o meio MS contendo 2,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D e 0,5 mg.l⁻¹ de quinetina, sob as mesmas condições de luz e temperatura (ZAGO, 1999).

Ensaio de transformação genética de folhas jovens e cotilédones de *Eucalyptus* via biolística foram realizados utilizando-se um acelerador de partículas de baixa pressão de gás

hélío (*Particle Inflow Gun*, FINER *et al.*, 1992). A análise histoquímica da atividade da proteína-repórter GUS (β -glicuronidase de *E. coli*), codificada pelo gene *gusA* presente no plasmídeo utilizado nos ensaios de bombardeamento, revelou uma baixa eficiência de transformação, com menos de 3 pontos azuis por 25 mm² de tecido. Utilizando os mesmos parâmetros e materiais, o bombardeamento de folhas jovens de fumo (*N. tabacum*) e de soja (*Glycine max*) demonstraram uma eficiência muito superior, com mais de 50 pontos azuis de expressão de *gusA* por 25 mm² (resultados não apresentados, COSTA, 1999). O emprego do mesmo explante vegetal como alvo e variações nas condições de pressão, distância, micropartículas e plasmídeos não resultaram em eficiências mais altas de transformação.

Alguns trabalhos relatam a obtenção de tecidos transgênicos de diferentes espécies de *Eucalyptus* utilizando estirpes selvagens de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* para mediar a transformação (LEROUX & VAN STADEN, 1991; MACRAE, 1991; CHRIQUI *et al.*, 1992). Embora tais trabalhos tenham comprovado a compatibilidade de infecção entre agrobactérias e tecidos dessas arbóreas e demonstrado a efetiva transferência de DNA para as células vegetais, não foram regeneradas plantas transgênicas. A dificuldade para a regeneração tem sido atribuída ao alto conteúdo em fitohormônios sintetizados por enzimas codificadas por genes do T-DNA selvagem, os quais promovem a franca multiplicação celular sem que haja diferenciação em tecidos organizados (HOOYKAAS & MOZO, 1994; RAVEN *et al.*, 1996; BRASILEIRO & LACORTE, 1998). Com vistas à futura regeneração de plantas transgênicas e férteis, portanto, estirpes desarmadas de *Agrobacterium* devem ser preferencialmente utilizadas nas transformações.

Dois experimentos independentes de transformação de *E. saligna* e *E. dunnii* foram realizados utilizando-se *A. tumefaciens* LBA4404::pTOK233 (HIEI *et al.*, 1994) como vetor. Em cada experimento, 100 cotilédones de plântulas de 10 dias (Figura 6) foram infectados com as agrobactérias essencialmente como descrito em BRA-

SILEIRO & CARNEIRO (1998). Cerca de 40 dias após a infecção dos cotilédones, 30% dos calos obtidos em meio MS contendo 100 mg.l⁻¹ de canamicina foram analisados histoquimicamente para a atividade da enzima-repórter GUS (Figura 6). Após 3 subcultivos em meio seletivo (15 dias/subcultivo), os calos foram transferidos para meio MS sem antibióticos para confirmar a eliminação das agrobactérias. Em ensaios histoquímicos, estes apresentaram



Figura 7 – Amplificação de fragmentos de *gusA* a partir de DNA genômico isolado de calos de *E. saligna* independentemente transformados.

Canaleta 1, mistura de reação sem DNA-molde; 2, DNA genômico de *E. saligna* não transformado (controle negativo); 3-10, DNA genômico de calos amplificados por *primers* específicos de *gusA*; 11, plasmídeo pGusKan (controle positivo); 12, marcador de tamanho de fragmentos de DNA. As condições de termociclagem utilizadas foram essencialmente as mesmas descritas na legenda da Figura 2

uma uniforme atividade de GUS, com uma coloração azul intensa (Figura 6). Considerando-se o número total de cotilédones de *E. saligna* infectados com *A. tumefaciens* LBA4404::pTOK233 nos dois experimentos (200) e o número de calos efetivamente transformados (18) segundo a expressão do gene *gusA*, estes resultados demonstraram uma eficiência de 9% de transformação genética. Cerca de 10% dos calos de *E. dunnii* recuperados dos cotilédones transformados com *A. tumefaciens* LBA4404::pTOK233 foram também positivos nos ensaios de GUS.

A presença de duas cópias do gene *virD2* em pTOK233, codificador da proteína envolvida no reconhecimento das seqüências flanqueadoras do T-DNA, na excisão, no transporte e na integração deste DNA de transferência ao genoma vegetal (HOOYKAAS & MOZO, 1994), além de outras características, realmente parece potencializar a capacidade de transformação de *Agrobacterium* (HIEI *et al.*, 1994). Esta conclusão se fundamenta no fato de nenhum calo ter sido recuperado a partir da infecção dos cotilédones com *A. tumefaciens* LBA4404::pMOG402Gus (resultados não apresentados, COSTA, 1999), sendo este um plasmídeo binário “ordinário” e não um plasmídeo “super-binário” como é denominado pTOK233 (HIEI *et al.*, 1994). É importante salientar que todas as condições da transformação, especialmente a concentração de bactérias utilizadas, foram as mesmas em todos os experimentos (COSTA, 1999; ZAGO, 1999).

Após vários subcultivos em meio seletivo seguido de meios não seletivos, os calos transformados de *E. saligna* foram analisados quanto à integração do T-DNA nos genomas celulares por meio da PCR. Dois pares de *primers* foram utilizados em duas PCRs visando amplificar fragmentos de 412 pb do gene *gusA* e 407 pb do gene *npII*. As seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos foram definidas de acordo com as seqüências desses genes disponíveis no GenBank (códigos de acesso S69414 e E00425). As PCRs foram executadas a partir de DNAs genômicos isolados dos calos de *E. saligna* transformados e que mostraram-se positivos nos ensaios histoquímicos de GUS. Como controle negativo, foi utilizado DNA genômico de *E. saligna* isolado de plântulas não transformadas. Como controle positivo, foram utilizadas preparações de DNA do plasmídeo pGusKan, contendo os genes *gusA* e *npII*. As tentativas de amplificação do gene *npII* não resultaram positivas, provavelmente por problemas nos *primers* utilizados ou pelas condições de tempo e temperatura das reações. Conforme apresentado na Figura 7, resultados positivos foram obtidos apenas nas amplificações de seqüências homólogas do gene *gusA*. Fragmentos de tamanho

esperado puderam ser observados em 5 das 7 amostras avaliadas de calos transformados, à semelhança do controle positivo. Nenhum sinal foi observado nas reações dos controles negativos. Embora a PCR possa amplificar seqüências do transgene *gusA* presente em agrobactérias persistentes nos tecidos infectados, a observação da nítida coloração azul nos calos avaliados, consequência da correta transcrição e tradução do transgene *gusA*-íntron, confirmam o status transgênico dos calos.

Conclusão e Perspectivas

Este trabalho representa um primeiro passo para o esclarecimento dos mecanismos gênicos envolvidos na biossíntese de ligninas em *E. saligna* e para a futura modulação dos teores ou composição deste biopolímero. Por intermédio das seqüências isoladas, plantas de *E. saligna* com perfis modificados de lignina podem, por exemplo, ser obtidas através da redução da atividade de CAD pela expressão, em orientação antisense, da seqüência *cad*. A atividade reduzida de CAD, no entanto, não implica diretamente em menores quantidades de ligninas presentes nas paredes celulares vegetais, como foi demonstrado em *N. tabacum* (HALPIN *et al.*, 1994) e *Populus* (BAUCHER *et al.*, 1996). Por outro lado, esses trabalhos demonstraram que a inibição da atividade de CAD leva à formação de ligninas de composição alterada mais facilmente separáveis pelos métodos normalmente utilizados na produção de polpa de celulose e papel.

Com vistas à alteração da composição ou teores de ligninas em plantas por meio da modulação da expressão de genes biossintetizantes, estudos mais aprofundados dos mecanismos de regulação gênica devem ser conduzidos. A seqüência de *cad* isolada neste trabalho poderá ser usada como ferramenta para a obtenção de seqüências regulatórias da região 5'-terminal do gene, bem como seqüências terminadoras. Além da análise dos elementos promotores, visando a contribuir para a maior compreensão do metabolismo secundário em plantas, outros genes de lignificação estão sendo isolados e caracterizados em nossos laboratórios, com especial atenção ao gene codificador da cinamoil-CoA redutase (CCR).

Os resultados promissores obtidos com a transformação genética de *Eucalyptus* por meio da infecção por *A. tumefaciens*, e a comprovação, pela PCR, da incorporação dos transgenes, indicam boas perspectivas futuras para a obtenção de plantas transgênicas para essas arbóreas. Embora o sistema *Agrobacterium*, segundo este trabalho, seja a ferramenta mais apropriada para a transformação de *Eucalyptus*, problemas técnicos associados às atividades de transformação genética por biolística e de regeneração de plantas a partir dos tecidos transformados devem ser solucionados. A transformação por biolística poderá resultar mais satisfatória se algumas condições alternativas do protocolo forem utilizadas, especialmente o emprego de um acelerador de partículas de alta pressão de hélio, e tecidos-alvo de *Eucalyptus* menos densos do que cotilédones, tais como calos friáveis ou meristemas. No que diz respeito a regeneração de plantas, nem todas as possibilidades de meios regenerativos foram testadas. Importante nestes ensaios é o tempo de cultura dos tecidos *in vitro*, que deverá ser bastante reduzido para a manutenção do potencial regenerativo dos mesmos. Experimentos neste sentido também estão sendo atualmente desenvolvidos.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Os autores são gratos à empresa Riocell S.A., de Guaíba, RS, e ao engenheiro florestal Teotônio F. de Assis, pela cedência de sementes e plantas de *Eucalyptus* para a realização destes estudos. Os autores agradecem, também, aos Drs. Jean M. Boudet e Jacqueline Grima-Pettenati, do Institute Paul-Sabatier, Toulouse, França, pela doação do cDNA de *E. gunnii* codificador de CAD.

Referências Bibliográficas

BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M. T.; PETIT-CONIL, M.;

CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulation a cynamnil alcohol dehydrogenase in Poplar. *Plant Physiology*. v. 112, p. 1479-1490, 1996.

BAUCHER, M.; VAN DOORSSELAERE, J.; GIELEN, J.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; BOERJAN, W. Genomic nucleotide sequence of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Physiology*. v. 107, p. 285-286, 1995.

BOUDET, A. M.; GOFFNER, D. P.; GRIMA-PAETTENATI, J. Lignins and lignification: a recent biochemical and biotechnological developments. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*. v. 319, p. 317-331, 1996.

BRASILEIRO, A. C. M. & CARNEIRO, V. T. C. Introdução à transformação genética de plantas. In: Brasileiro, A.C.M.; CARNEIRO, V. T. C., eds. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-Cenargem, p. 13-16, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. & LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Brasileiro, A.C.M.; CARNEIRO, V. T. C., eds. *Manual de Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-Cenargem, p. 75-92, 1998.

CHRIQUI, D., ADAM, S., CAISSARD, J., NOIN, M., AZMI, A. Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus gunnii*. In: Schsnau, A. P. G., ed. *The Role of Eucalypts*. IUFRO Symposium on Intensive Forestry. Pretoria: Southern African Institute of Forestry, p. 70-80, 1992.

COSTA, P. Geração e análise de plantas transgênicas de *Eucalyptus* spp. Dissertação de Bacharelado, Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, 57 p., 1999.

DIXON, R. A. & LAMB, C. J. Regulation of secondary metabolism at the biochemical and genetic levels. In: CHARLWOOD, B. V. *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Oxford: Oxford University Press, p. 101-116, 1990.

FEUILLET, C.; LAUVERGEAT, V.; DESWARTE, C.; PILATE, G.; BOUDET, A.; GRIMA-PETTENATI, J. Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in

- transgenic poplar plants. *Plant Molecular Biology*. v. 27, p. 651-667, 1995.
- FINER, J. J.; VAIN, P.; JONES, M. W.; McMULLEN, M. D. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports*, v. 11, p. 323-328, 1992.
- GALLIANO, H.; CABANÉ, M.; ECKERSON, C.; LOTTSPPEICH, F.; SANDERMANN, H. & ERNST, D. Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone-induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Molecular Biology*. v. 23, p. 145-156, 1993.
- GCG - GENETICS COMPUTER GROUP. Wisconsin Package Version 9.1. 575 Science Drive, Madison, Wisconsin 53711, USA, 1997
- GRIMA-PETTENATI, J.; FEUILLET, C.; GOFFNER, D. P.; BORDERIES, G.; BOUDET, A. M. Molecular cloning and expression of a *Eucalyptus gunii* cDNA clone encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Molecular Biology*. v. 21, p. 1085-1095, 1993.
- HALPIN, C.; KNIGHT, M. E.; FOXON, G. A.; CAMPBELL, M. M.; BOUDET, A. M.; BOON, J. J.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M. T.; SCHUCH, W. Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *The Plant Journal*. v. 6, p. 339-350, 1994.
- HIBINO, T.; CHEN, J-Q.; SHIBATA, D.; HIGUCHI, T. Nucleotide sequence of *Eucalyptus botryoides* gene encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Physiology*. v.104, p. 305-306, 1994.
- HIBINO, T.; SHIBATA, D.; CHEN, J-Q.; HIGUCHI, T. Cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Aralia cordata*: cloning of the cDNA and expression of the gene in lignified tissues. *Plant Cell Physiology*. v.34, p. 659-665, 1993.
- HIBINO, T.; TAKABE, K.; KAWAZU, T.; SHIBATA, D.; HIGUCHI, T. Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biosci. Biotech. Biochem.* v. 59 (5), p. 929-931, 1995.
- HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. Efficient transformation of rice (*Oriza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, v. 6 (2), p. 271-282, 1994.
- HOOYKAAS, P. J. J. & MOZO, T. *Agrobacterium* molecular genetics. In: GELVIN, S. B. & SCHILPEROORT, R. A., eds. *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. B3/1-9, 1994.
- KNIGHT, M. E.; HALPIN C.; SCHUCH, W. Identification and characterization of cDNA clones encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco. *Plant Molecular Biology*. v.19, p. 793-801, 1992.
- LAUVERGEAT, V.; KENEDY, K.; FEUILLET, C.; MCKIE, J. H.; GORRICHON, L.; BALTAS, M.; BOUDET, A. M.; GRIMA-PETTENATI, J. & DOUGLAS, K. T. Site-Directed Mutagenesis of a Serine Residue in Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, Affects the specificity for Coenzyme. *Biochemistry*. v. 34, p. 12426-12434, 1995.
- LEROUX, J. J. & VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - a review. *Tree Physiology*, v. 9, p. 435-477, 1991.
- LONGEMANN, E.; REINOLD, S.; SOMSSICH, I. E.; HAHLBROCK, K. A novel type of pathogen defense-related cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biol. Chem.* v. 378 (8), p. 909-913, 1997.
- MACKAY, J. J., WEIWEI, L.; WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. R.; O'MALLEY, D. M. Genetic analysis of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine: single gene inheritance, molecular characterization and evolution. *Molecular and General Genetics*. v. 247, p. 537-545, 1995.
- MACRAE, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of Eucalypts to improve rooting ability. In: Schsnau, A. P. G., ed. The Role of Eucalypts. IUFRO Symposium on Intensive Forestry. Pretoria: Southern African Institute of Forestry, 1991. p. 117-125.
- MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin networks. *Annales des Sciences Forestières*. v. 46, p. 846-855, 1989.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAKASHIMA, J.; TATSUYA, A.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia mesophyll* cells. *Plant Cell Physiology*. v. 38, p. 113-123, 1997.
- NORTHCOTE, D. H. Control of plant cell wall biogenesis: an overview. *ACS Symp. Ser.* v. 399, p. 1-15, 1989.
- O'MALLEY, D.; PORTER, S.; SEDEROFF, R. Purification, characterization and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiology*. v. 98, p. 1364-1371, 1992.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E. eds. *Biologia Vegetal*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 524-532, 1996.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. T. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*. v. 18, p. 259-288, 1980.
- VAN DOORSSELAERE, J., BAUCHER, M., CHOGOT, E., CHABBERT, B., TOLLIER, M. T., PETIT-CONIL, M., LEPLÉ, J. M., PILATE, G., CORNU, D., MONTIES, B., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D., BOERJAN, W., JOUANIN, L. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant Journal*. v. 8, p. 855-864, 1995.
- VOM ENDT, D. Isolamento e caracterização do gene codificante da enzima álcool cinamílico desidrogenase de *Eucalyptus saligna*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, 94 p., 1999.
- ZAGO, M.K. Transformação genética de *Eucalyptus dunnii* e isolamento de genes envolvidos na biosíntese de lignina. Dissertação de Bacharelado, Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, 73 p., 1999.