

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

**Caracterização de promotores tecido-específicos de
algodão**

ESTELA REIS DE ANDRADE

Orientador: Francisco José Lima Aragão

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2020

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE**

ESTELA REIS DE ANDRADE

**Caracterização de promotores tecido-específicos de
algodão**

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Biotecnologia e
Biodiversidade da Universidade de Brasília
para obtenção do título de Doutora em
Biotecnologia e Biodiversidade.

Brasília
Distrito Federal - BRASIL
2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

Defesa de tese de autoria de Estela Reis de Andrade, intitulada “Caracterização de promotores tecido-específicos de algodão” apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia e Biodiversidade pela Universidade de Brasília, em (30/10/2020)

Aprovada pela banca examinadora:

Dr. Francisco José Lima Aragão
Orientador
(Presidente)

Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres
Universidade de Brasília
(Examinador interno)

Dra Lucilia Helena Marcellino
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinadora externa)

Dra Elínea de Oliveira Freitas
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
(Examinadora externa)

DEDICATÓRIA

À Maria Laine Tinoco *in memoriam*,
Por me ensinar o que é vida, dedico

À Amanda Pinheiro, minha melhor amiga
e doutora “por tabela”, ofereço

AGRADECIMENTOS

Considero os agradecimentos uma das partes mais importantes de um trabalho científico, desde o mais simples ao mais complexo. Certamente o faria ao final de tudo, quando terei o coração grato ao ver a tese pronta, mas desta vez será diferente. Tenho uma licença quase poética para fazer isso. Explico! Estamos em plena quarentena devido à pandemia causada pela COVID19. Sim, minha tese foi toda escrita em um momento difícil e essa parte dos agradecimentos veio para o papel antes mesmo da discussão dos resultados. Acredito que para tudo há uma razão e, desta vez, não foi diferente.

Neste contexto e considerando a fé que me acompanha há quase 20 anos, meu agradecimento mais genuíno é a Deus, dono da minha vida e motivo da minha busca incessante por dias melhores. Não posso vê-Lo, mas é surreal como posso sentir. É clichê, mas sigo agradecendo minha família porque reconheço a importância de cada um na minha formação na pesquisa e como pessoa. Pedro e Ediene merecem mais atitudes que palavras, o português inteiro não é suficiente para expressar meu amor e gratidão. Flávia e Luciana são companheiras de jornada e dividem comigo tudo, às vezes de longe, mas basta uma palavra e a gente sente que está sempre perto. Maria é meu lugar seguro para falar sobre tudo. Divide a vida comigo desde que nasci e é minha segunda mãe por merecimento!

Produzir algo na ciência exige maturidade e uma resiliência sem fim. E a resiliência vem, principalmente, de sofazinho e café, de troca de risadas, de palavras, de ideias e de uma escuta paciente de amigos. “Amigos que são céu e chão”. Começo, então, pela oportunidade que tive de passar os meus primeiros 6 meses de doutorado com a Maria Laine me ensinando que uma PCR que deu errado é só isso e nada mais, que deitar na grama e olhar para o céu pode ser um afago na alma. “Vive, Estela, vive!”. ML foi e é “a dose mais forte e lenta de uma gente que ri quando deve chorar”. Nunca vou conseguir ser grata o suficiente à Deus por um dia ter experimentado a sua amizade!

Sigo com Amanda, que em um dia que eu quis desistir, me disse que queria “ser doutora por tabela”. Mal sabe ela que é, para mim, doutora *honoris causa* e detém a minha maior admiração, por ser forte para produzir resultados que até hoje ecoam no seu grupo de pesquisa e mais que isso, por ser sábia e tomar a difícil decisão de parar quando foi necessário. Amanda é minha melhor amiga e tem boa parte do meu amô! Ao Ricardo G. minha imensa gratidão, repleta de carinho pela força nas horas que precisei, por ter

editado uma a uma as fotos do segundo capítulo do meu doutorado, pela opinião profissional sobre a melhor forma de apresentar resultados em imagens e por ter me dado tanto do seu carinho e cuidado de mim, foi essencial!

O doutorado me deu grandes amigos. ML foi e me deixou Kenny que ganhou de cara meu amor. Natália divide comigo paixões culinárias e é uma das minhas maiores referências de gentileza, delicadeza, profissionalismo e amizade. Tomas foi minha risada nas horas mais chatas da vida. Natália e Tomas me ajudaram de uma forma que eu nem consigo descrever. Estavam cuidando das minhas plantas e até mesmo assumindo experimentos enquanto eu assumia a minha posição enquanto servidora da UnB. Metade do meu diploma é de vocês! Lídia... Ah, nem sei o que dizer! Lídia me deu a força necessária para continuar em vários momentos. Ensinou-me que nós mulheres somos fortes sim e capazes sim! Você não imagina quanta gratidão eu tenho por ser sua amiga. Thaís, companheira de bancada e de chegadas cedo no lab, trocadora oficial de bilhetes escritos. Elsa! Minha mãe na Embrapa, minha conselheira e meu abraço acalentador! Não tem uma única palavra que descreva o tanto que amo e como sou grata por saber que tenho você!

Ao Francisco Aragão, meu profundo agradecimento por me receber três vezes em seu laboratório. Obrigada por orientar este trabalho, todos os outros que passaram pela minha mão mais de quatro anos e por respeitar as minhas escolhas de trajetória profissional. Obrigada também por tantas vezes parar ao lado da minha bancada e contar as suas histórias de vida. Você consegue ser orientador científico e de vida também e é uma enorme referência de cientista! A todos os colegas do LEG e do doutorado na UnB, minha gratidão por cada ajuda, por mais simples que tenha sido. Representou muito do que hoje sou! Ao prof. Everaldo Anastácio, meu eterno agradecimento pela amizade, por me apresentar o melhoramento de plantas, por me orientar sempre (no mais profundo e verdadeiro sentido de orientação) e me levar à uma reunião no MAPA, onde conheci o Francisco. À Sarah Caldas por me incentivar em meus primeiros passos na pesquisa, desde o meu primeiro Pibic lá em 2009 até hoje. Você é uma referência de mulher na pesquisa, obrigada pelo exemplo!

À prof^a Lucrecia Ramos, muito mais que minha chefe, desempenha um papel maternal desde que assumi meu cargo em seu laboratório. Gratidão pelas inúmeras horas de conversa, por todos os momentos de: “e o doutorado, como está?”. Obrigada por abrir

mão do meu trabalho tantas vezes para que eu finalizasse esta tese. Obrigada à prof^a Alessandra Monteiro pela compreensão. Ao Manuel, pelo companheirismo e força em infinitos dias no laboratório escrevendo. Ao prof. Márcio Mendonça por ser meu exemplo de força e perseverança, morro de orgulho da sua trajetória! E de uma forma emocionada e repleta do maior carinho que posso ter, minha mais do que grande gratidão à Andreia Sasse, por me auxiliar e estar perto em TODOS os dias desta jornada! Você não imagina o quanto é importante para mim!

Ao Instituto Mato-grossense do Algodão pela concessão da bolsa de estudo. Aos professores da Universidade de Brasília por tanto conhecimento compartilhado de uma forma tão gentil. Aos membros das bancas, de qualificação e defesa, por enxergarem o que meu cansaço e meu limitado conhecimento não me permitiram. A contribuição de cada um de vocês foi essencial. À Elinea Freitas, em especial, pelo cuidado e ajuda na apresentação da tese. Gratidão a todos os que não estão indicados aqui, mas contribuíram. Foi através de cada um que construí esta trajetória!

Em mim, o desencontro com a palavra, só a palavra pode reparar.

Camila Lordelo

RESUMO

Andrade, Estela Reis de. Universidade de Brasília. Outubro de 2020. **Caracterização de promotores tecido-específicos de algodão**. Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

O algodoeiro é largamente cultivado em diversos países e se destaca por ser a maior fonte de fibra natural e de alta qualidade para uso na indústria têxtil. A adoção de cultivares transgênicas resulta em benefícios substanciais para os produtores. Entretanto, o processo de transformação genética do algodoeiro é ainda difícil e representa um fator limitante. Portanto, o isolamento e a caracterização de novos promotores compõem uma etapa essencial no processo de obtenção de plantas resistentes a pragas. Neste trabalho foi caracterizado, inicialmente, o promotor constitutivo do gene *act2* em flores e frutos de algodão e, posteriormente, dez promotores isolados de genes tecido-específicos identificados em algodão e *Arabidopsis thaliana*. Para a caracterização do promotor do gene *act2* foram utilizadas plantas da linhagem 20/4 oriundas de transformação estável previamente realizada. Flores e frutos destas plantas foram submetidos a testes histoquímicos para avaliação do gene *gus* e a ensaio fluorimétrico para quantificação da expressão. O isolamento e caracterização dos dez promotores com atividade tecido-específica foi realizado em duas etapas. A primeira, realizada no Instituto Matogrossense do Algodão (IMAmt), englobou a coleta de tecidos de algodoeiro e preparo das amostras de RNA. Na Evogene, um conjunto de genes foi selecionado e caracterizado *in silico* por meio da utilização da plataforma de predição de promotores RePack. Os genes com expressão preferencial em tecidos reprodutivos e com baixa ou nenhuma expressão na raiz foram escolhidos e, deles, dez promotores foram isolados. As sequências foram clonadas em vetores de transformação de plantas controlando a expressão do gene *gus*. Os ensaios histoquímicos foram realizados em plantas de *A. thaliana* e algodão. O promotor do gene *act2* se mostrou forte e capaz de dirigir altos níveis de expressão em todos os tecidos avaliados de flor e fruto de algodoeiro. Quanto aos dez promotores com atividade tecido-específica, não foi observada relação do perfil de expressão em tecidos de *A. thaliana* com a expressão em tecidos de algodoeiro. O promotor IMA 001 apresentou perfil constitutivo em algodoeiro, com atividade semelhante ou superior ao controle positivo CaMV35S. Os promotores IMA 006 e IMA 010 tiveram a maior atividade em tecidos reprodutivos ao mesmo tempo em que mostraram baixa ou nenhuma atividade em tecidos vegetativos e de raiz, o que sugere que possam ser alternativas

viáveis para o uso em construções genéticas que visem a resistência ao bicudo-do-algodoeiro. Entretanto, de todas as alternativas avaliadas neste trabalho, o promotor *act2* foi o que dirigiu a maior expressão nos tecidos-alvo do bicudo-do-algodoeiro.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, transgenia, transformação genética, bicudo-do-algodoeiro.

ABSTRACT

Andrade, Estela Reis de. University of Brasília. October 2020. **Characterization of tissue specific cotton promoters.** Doctoral advisor: Francisco José Lima Aragão.

Cotton is largely cultivated in many countries and stands out for being a source of natural and high-quality fiber for textile industry. The adoption of transgenic variety led to many benefits for farmers, however the cotton genetic transformation process is still a limiting factor. In this way, isolation and characterization of new promoters constitute an essential step in the process of obtaining pest-resistant plants. In this study, we first characterized the constitutive promoter *act2* in cotton flowers and bolls and then, ten promoters from tissue-specific genes identified in cotton and *Arabidopsis thaliana*. For the *act2* gene promoter characterization, we used plants (lineage 20/4) from stable transformation previously performed. GUS histochemical staining and fluorometric assays were performed with cotton flowers and bolls. The isolation and characterization of ten tissue-specific promoters were realized in two steps. The first, realized in Mato Grosso Institute of Cotton, included the cotton tissues collection and RNA sample prepare. In Evogene, a gene dataset was selected and characterized *in silico* using the RePack platform. The genes with preferential expression in reproductive tissues and low or no expression in vegetative tissues were choose and, from them, ten promoters were isolated. The sequences were cloned into plant transformation vectors controlling *gus* expression. The histochemical assays were carried out using *A. thaliana* and cotton plants. The *act2* promoter was capable to drive high level of gene expression in cotton flower and boll tissues. For the ten tissue-specific promoters, no relation was observed between the expression profile in *A. thaliana* and cotton tissues. The IMA 001 promoter presented constitutive profile in cotton, similar to CaMV35S. The IMA 006 and IMA 010 had the highest activity in reproductive tissues while showed low or no expression in vegetative and root tissues, which suggests that they may be suitable alternative for use in genetic constructs that target cotton boll weevil resistance. However, considering all the alternatives evaluated in this study, the *act 2* promoter was the one that drove the highest expression in the desired tissues.

Keywords: *Gossypium hirsutum*, *Arabidopsis thaliana*, transgenic, genetic transformation, boll weevil

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
Revisão de literatura.....	6
Referências bibliográficas.....	11
Justificativa.....	16
Objetivos.....	17
Objetivo geral.....	17
Objetivos específicos.....	17
Apresentação dos resultados da tese.....	18
Capítulo 1- Caracterização funcional do promotor do gene <i>act 2</i> de <i>A. thaliana</i> em flores e frutos de algodão (<i>G. hirsutum</i>)	
1 Introdução.....	20
2 Material e métodos.....	21
3 Resultados e discussão.....	22
4 Conclusão.....	25
5 Referências bibliográficas.....	28
Capítulo 2- Caracterização funcional de dez promotores tecido-específicos em <i>A. thaliana</i> e avaliação em algodão (<i>G. hirsutum</i>)	
1 Introdução.....	29
2 Material e métodos.....	30
2.1 Escolha dos promotores.....	30
2.2 Vetores de expressão.....	32
2.3 Material vegetal e ensaios de expressão.....	34
3 Resultados.....	39
3.1 Escolha dos promotores.....	39
3.2 Ensaios histoquímicos de GUS com <i>A. thaliana</i>	43
3.3 Avaliação dos resultados em <i>G. hirsutum</i>	51

4 Discussão.....	63
5 Conclusão e Perspectivas.....	69
6 Referências bibliográficas.....	70
Anexo – Functional characterization of the <i>Arabidopsis</i> actin 2 promoter in cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) flowers and bolls.....	74

Lista de Figuras

Capítulo 1- Caracterização funcional do promotor do gene *act 2* de *A. thaliana* em flores e frutos de algodão (*Gossypium hirsutum*)

- Figura 1. Representação esquemática do vetor pAG1 com o gene *gus* sob controle do promotor *act2*..... 21
- Figura 2. Representação esquemática do vetor pAHAS35SGUS com o gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S..... 22
- Figura 3. Ensaio quantitativo da atividade específica do GUS em folhas, raízes, pétalas e fibra de algodoeiro com o gene *gus* dirigido pelos promotores CaMV35S e *act2*..... 23
- Figura 4. Expressão do gene *gus* dirigido pelo promotor *act2* em algodão transgênico (geração T₄) em tecidos florais..... 24
- Figura 5. Atividade do gene *gus* dirigida pelo promotor *act2* em frutos de algodão transgênico (geração T₄)..... 25

Capítulo 2 - Caracterização funcional de dez promotores tecido-específicos em *A. thaliana* e avaliados em algodão (*Gossypium hirsutum*)

- Figura 1. Estágios dos botões florais de algodoeiro coletados no início do desenvolvimento (A), com tamanho médio (B), botão floral na fase final de desenvolvimento (C) e flor branca não fecundada (D). Rechie et al., 2004..... 30
- Figura 2. Estágios de frutos de algodoeiro coletados com 18 (A) e 25 (B) dias após a polinização no IMAmt..... 31
- Figura 3. Representação esquemática do vetor pC3301IMA001pro com o gene *gus* sob controle do promotor IMA 001..... 33
- Figura 4. Representação esquemática do vetor pIMA001proGUS com o gene *gus* sob controle do promotor IMA 001..... 34
- Figura 5. Cultivo e transformação de *A. thaliana*. A: Plântulas uma semana após o plantio. B: Plântulas três semanas após o plantio e prontas para individualização. C: Plantas individualizadas em crescimento vegetativo. D: Início do desenvolvimento de inflorescências. E: Plantas em câmara de umidade logo após a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o método floral dip.. 35
- Figura 6. Seleção de plantas transgênicas após a aplicação de glufosinato de amônio (GA) em comparação com o tratamento controle com e sem GA..... 36

Figura 7. Tecidos de sementes imaturas de algodoeiro posicionadas em placa de Petri contendo meio MS para bombardeamento.....	38
Figura 8. Frutos de algodoeiro em quatro estágios de desenvolvimento (15 mm, 20 mm, 25 mm e 30 mm) utilizados para retirada das sementes imaturas testadas quanto ao padrão de expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos diferentes promotores.....	38
Figura 9. Representação gráfica da ordem de priorização de potenciais genes encontrados em tomate utilizando a plataforma de expressão gênica Affymetrix, baseado na prioridade de tecidos em que a expressão era desejada.....	41
Figura 10. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 017 em folha, flor, sílica e raiz de <i>A. thaliana</i> transformada com o vetor pC3301IMA017pro.....	47
Figura 11. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 027 em folha, flor, sílica e raiz de <i>A. thaliana</i> transformada com o vetor pC3301IMA027pro.....	48
Figura 12. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor CaMV35S em folha, flor, sílica e raiz de <i>A. thaliana</i> transformada com o vetor pC3301.....	49
Figura 13. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 001 em folha, flor, sílica e raiz de <i>A. thaliana</i> transformada com o vetor pC3301IMA001pro.....	50
Figura 14. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 025 em folha, flor, sílica e raiz de <i>A. thaliana</i> transformada com o vetor pC3301IMA025pro.....	51
Figura 15. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor CaMV35S em A: folha, B: pecíolo e C: radícula de <i>G. hirsutum</i> transformados com o vetor pUC35SGUS.....	52
Figura 16. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 001 em A: folha, B: pecíolo e C: radícula de <i>G. hirsutum</i> transformados com o vetor pIMA001proGUS.....	53
Figura 17. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor A: IMA 030 em B: IMA 036 em radícula de <i>G. hirsutum</i>	53
Figura 18. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 025 em tecidos vegetativos de algodoeiro (A: folha, B: pecíolo e C: radícula).....	54
Figura 19. Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA010 e C: IMA017 em secção do estigma da flor de algodoeiro coletada no estágio de antese.....	55

Figura 20.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA001, C: IMA010 e D: IMA025 em anteras da flor de algodoeiro coletada no estágio de antese.....	56
Figura 21.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA001, C: IMA006, D: IMA010 em secções de botão floral de algodoeiro.....	56
Figura 22.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor CaMV35S no carpelo do fruto de algodoeiro transformado via biobalística com o vetor pUC35SGUS.....	58
Figura 23.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor A: CaMV35S, B: IMA 006 e C: IMA 010 em frutos de algodoeiro no estágio inicial de desenvolvimento.....	58
Figura 24.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 025 observada na semente no fruto de algodoeiro em estágio inicial de desenvolvimento.....	59
Figura 25.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor A: CaMV35S, B: IMA 006 e C: IMA 010 em frutos de algodoeiro no estágio final de desenvolvimento do fruto.....	59
Figura 26.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor A e B: CaMV35S, C e D: IMA 036, E e F: IMA 006 e G e H: IMA 010 no cotilédone, embrião e endosperma de sementes maduras de algodoeiro.....	61
Figura 27.	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle do promotor IMA 025 no A: embrião, B: cotilédone, C: endosperma de sementes maduras de algodoeiro	61
Figura 28.	Expressão do gene <i>gus</i> sob o controle dos promotores A – E: CaMV35S e F-I: IMA 010 nas fases de desenvolvimento da semente imatura de algodoeiro.....	62

Lista de Tabelas

Capítulo 2 - Caracterização funcional de dez promotores tecido-específicos em *A. thaliana* e avaliados em algodão (*Gossypium hirsutum*)

Tabela 1.	Tecidos de algodoeiro utilizados em ensaios de expressão transiente e suas respectivas formas de coleta.....	37
Tabela 2.	Escala de notas utilizada para avaliação da atividade do gene <i>gus</i> em cada tipo de tecido de algodoeiro testado por meio da área azul observada.....	39
Tabela 3.	Categorização de tecidos de algodoeiro de acordo com o padrão de expressão – desejado/indesejado no estudo de promotores tecido-específicos.....	40
Tabela 4.	Relação dos promotores escolhidos para a realização dos ensaios de expressão após a priorização heurística com base em cinco critérios de avaliação.....	42
Tabela 5.	Intensidade de expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA em folha, flor, sílica e raiz de dez plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas.....	45
Tabela 6	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em folha, pecíolo e radícula de <i>G. hirsutum</i> e expressos em escala de notas (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).....	52
Tabela 7	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em antera, ovário e botão floral de <i>G. hirsutum</i> e expressos em escala de notas (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).....	54
Tabela 8	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em fibra, carpelo, semente e pericarpo de dois estágios de desenvolvimento do fruto de <i>G. hirsutum</i> e expressos em escala de notas (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).....	57
Tabela 9	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em endosperma, cotilédone e embrião de sementes de <i>G. hirsutum</i> e expressos em escala de notas (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).....	60
Tabela 10	Expressão do gene <i>gus</i> sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em sementes imaturas de <i>G. hirsutum</i> e expressos em escala de notas (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).....	62

Lista de abreviaturas

act: actina

AHAS: enzima aceto-hidroxiácido sintase

Bt: Bacillus thuringensis

CaMV: *Cauliflower Mosaic Virus*

DAP: Dias após a polinização

Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GA: Glufosinato de amônio

GM: Geneticamente modificado

GUS: enzima β -glucuronidase

IMAmt: Instituto Mato-Grossense do Algodão

MS: Murashige e Skoog

PBS: Phosphate buffered saline

PCA: Plot component analysis

X-gluc: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl b-D-glucuronide cyclohexylammonium salt monohydrate

REVISÃO DE LITERATURA

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L., Malvaceae) é cultivado em cerca de 150 países localizados em cinco continentes e destaca-se por produzir anualmente cerca de 2,03 milhões de toneladas e por prover renda para aproximadamente 100 milhões de famílias. A área cultivada em 2019 ocupou mais de 33 milhões de hectares principalmente na Ásia, Estados Unidos da América, Brasil e África. Neste contexto, o Brasil é anualmente responsável por 12% da produção mundial (Observatory of Economy Complexity, 2018; Tarazi et al., 2020).

O produto de maior valor comercial é a fibra que se caracteriza por ser longa, fina e de alta qualidade e por isso é tem sido a mais utilizada pela indústria têxtil (Fang, 2016). Avanços biotecnológicos que visem à melhoria do comprimento e força da fibra, bem como a maturidade de fruto e a resistência a insetos e patógenos são importantes, tendo em vista que todos estes aspectos influenciam no produto obtido (Stiff et al., 2016). Nos sistemas de cultivo de algodão ao redor do mundo, mais de 1300 pragas (entre insetos e ácaros) já foram encontradas. Menos de 1% delas, entretanto, causam perdas econômicas que podem variar de 10 a 30%. Os mais importantes são o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) que juntos, representam a causa principal de desenvolvimento e expansão do controle por inseticida bem como os esforços de desenvolvimento de variedades de algodão GM com resistência a pragas (Oliveira et al., 2016).

O bicudo-do-algodoeiro foi introduzido no Brasil no início dos anos 80 e, segundo Miranda e Rodrigues (2014) os danos causados são tão drásticos que a história da cotonicultura pode ser dividida em duas, antes e depois desta praga. Estes danos se devem tanto à sucção para alimentação quanto à oviposição e podem chegar a 100% de um cultivo. As larvas levam aproximadamente três semanas até atingirem a fase adulta, ou seja, em um ano podem ocorrer de 7 a 10 gerações. Cada fêmea pode depositar até 300 ovos em botões florais e frutos jovens de algodão onde as larvas se alimentam e se desenvolvem. Este hábito endofítico compromete a qualidade da fibra e provoca o aborto de botões florais e frutos, o que resulta na redução da efetividade do controle químico (Salvador et al., 2014; Magalhães et al., 2016)

Neste contexto, são necessárias de 12 a 15 aplicações de inseticida para atingir o máximo de eficácia, dependendo do nível de infestação, o que representa um custo

elevado para o produtor e, algumas vezes, torna o investimento inviável. Estima-se que as perdas cheguem a 200 dólares/hectare, o que representa mais de 10% do total do custo de produção. Para minimizar os danos, os produtores vêm adotando uma série de medidas, tais como o monitoramento do nível de infestação, destruição dos resíduos da colheita, eliminação de plantas remanescentes e uso de armadilhas. Entretanto, isto contribui para a redução dos níveis de infestação em apenas 4% (Rolim et al., 2019; Barros et al., 2020).

No intuito de controlar a população de insetos-praga em várias regiões do mundo, diversos eventos transgênicos de algodão foram lançados e adotados com sucesso nos últimos anos. A adoção reflete múltiplos e substanciais benefícios tanto para os pequenos quanto para os grandes produtores devido ao aumento da produtividade e a redução no uso de inseticidas químicos que permite a redução dos custos da produção, dos casos de intoxicação de trabalhadores por inseticida e o aumento da atividade de controle biológico de inimigos naturais das pragas (Flachs et al., 2017; Hussainan et al., 2020).

O rápido crescimento da área de algodão geneticamente modificado (GM) já é observado, apontando avanços no plantio de cultivares com esta tecnologia no Brasil. Em 2018, 1 milhão de hectares foram plantados e destes, 11% com genes de resistência a insetos, 30% com genes de resistência a herbicida e 59% com ambos (James, 2018). O Brasil tem, atualmente, 23 eventos transgênicos de algodão registrados, 14 deles com foco na resistência a pragas (ISAAA, 2019).

Apesar da tecnologia GM já ser amplamente utilizada, existem poucas estratégias que visem o controle do bicudo-do-algodoeiro e ainda sem aplicação comercial, mostrando assim a importância de mais estudos nesta área. Dentre as poucas alternativas, Macedo et al. (2017) concluíram que o nocaute mediado por RNAi do gene *AgraCHS2* afetou o desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro, resultando em 100% de mortalidade dos adultos. Recentemente, foi demonstrado que a expressão do transgene *Cry10aA* sob o controle de promotores específicos de verticilos florais tem relação com o maior acúmulo de proteína nestes órgãos, o que contribui para o aumento da resistência às larvas do bicudo (Ribeiro et al., 2020).

O desenvolvimento de plantas GM pela incorporação de genes de diferentes origens é o método mais promissor e rápido de gerar cultivos resistentes às mais diversas pragas e patógenos (Dubey et al., 2020). No caso do algodão, a maioria dos métodos de

transformação genética datam das últimas três décadas – via *Agrobacterium tumefaciens* (Firoozabady et al., 1987) e biobalística (Umbeck et al., 1987) e permanecem sendo difíceis, ineficientes e dispendiosos comparado a outras espécies. Devido a isso, o seu uso no melhoramento ainda permanece limitado, não só pelo processo de transformação, mas também pela dificuldade em se obter plantas regeneradas. Há, portanto, uma necessidade de concentrar esforços no sentido de melhorar a eficiência de transformação para tornar os métodos mais aceitáveis e eficientes (Wang et al., 2019; Hussainan e Mahmood, 2020).

A transformação genética se refere à manipulação direta do DNA para alterar determinada característica de um organismo. O gene de interesse pode ser transferido diretamente ou através da inserção em um vetor contendo o promotor, o gene de interesse e o terminador. Neste sistema, o promotor é essencial para o controle da expressão do transgene, ao mesmo tempo em que provê valiosas informações sobre silenciamento em resposta a estímulos externos.

A transformação genética consiste em um método de transferência do gene de interesse por meio de um cassete de transformação contendo o promotor, o gene de interesse e o terminador. Neste sistema, o promotor é essencial para o controle da expressão do transgene, ao mesmo tempo em que provê valiosas informações sobre silenciamento em resposta a estímulos externos. O promotor é definido como uma sequência de DNA que contém uma composição única de elementos *in cis* que se ligam a fatores de transcrição, de forma a permitir uma regulação específica da transcrição (Hernandez-García et al., 2014; Shahmuradov et al., 2017).

O promotor é composto por elementos regulatórios *in cis* que permitem ligações com fatores de transcrição e o correto posicionamento da maquinaria transcricional. Desta forma, regulam quando, como, onde e por quanto tempo um determinado gene é expresso, em resposta aos estímulos internos ou externos (Bilas et al., 2016; Porto et al., 2014). Quando os fatores de transcrição se ligam a promotores constitutivos, estes são disponibilizados e ativos em todo o tempo, enquanto a ligação com promotores tecido-específicos é feita apenas em determinados tecidos e/ou em certos estágios de desenvolvimento ou ainda com promotores induzíveis em resposta a interação com o meio ambiente (Peremarti et al., 2010).

No contexto de biotecnologia vegetal, os promotores constitutivos apresentam alta diversidade e têm duas fontes majoritárias: vírus que infectam plantas e genes

denominados *housekeeping*. Os vírus que infectam plantas têm genes pequenos e fáceis de definir e manipular in vitro enquanto os genes denominados *housekeeping* codificam proteínas que são requeridas por todas as funções básicas da célula. As principais classes são as ubiquitinas, actinas, precursor da proteinase aspártica e o fator de alongação 1-alfa (Peremarti et al., 2010; Erpen et al., 2018). Devido a isto, vários promotores constitutivos ainda são muito usados atualmente, destacando-se o do RNA 35S do Cauliflower mosaic virus (CaMV) (chamado de CaMV35S) em dicotiledôneas e *Ubiquitin1* em monocotiledôneas (Han et al., 2015).

Entretanto, a expressão do transgene em todas as partes da planta e durante todo o seu ciclo de vida pode eventualmente conduzir a efeitos indesejados no crescimento e desenvolvimento. A alta taxa de expressão constitutiva pode representar uma carga metabólica extra que resulta em efeitos *non-target* em outras rotas metabólicas da planta e conduz a efeitos pleiotrópicos indesejados (Kasuga et al., 1999). Há também episódios de silenciamento descritos em alface e gentiliana, ambos pela utilização do promotor CaMV35S (Mishiba et al., 2010; Okumura et al., 2016). Vale ressaltar ainda que o processo de silenciamento foi observado em menor prevalência quando promotores constitutivos provenientes de planta foram utilizados (Potenza et al., 2004).

O promotor CaMV35S proveniente de vírus continua sendo o mais utilizado na engenharia genética de plantas – aproximadamente 80% das cultivares geneticamente modificadas (GM) plantadas ainda carregam uma versão deste promotor, destacando-se variedades como soja RR (*Roundup Ready*), milho e algodão Bt (geneticamente modificados com genes de *Bacillus thuringiensis*) e mamão Sunset papaya (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>). Entretanto o seu uso vem aos poucos diminuindo por diversos motivos. Dentre eles está a identificação e caracterização de novos promotores “fortes” e constitutivos que são de origem vegetal e, por isso, mais aceitos. Além disso, existem estudos mostrando que o promotor CaMV35S exibe um padrão desigual, ou seja, não está ativo em todos os tipos de tecidos e células. Há ainda relatos de que pode afetar a expressão não somente do transgene, mas também de outros genes próximos, possivelmente via regiões de *enhancers* (Somssich, 2019).

Assim como o CaMV35S, os demais promotores derivados de vírus ou bactéria podem ter problemas funcionais para uso na engenharia genética do que promotores endógenos de plantas. Se comparados, os que são provenientes de planta são mais

apropriados e reduzem a possibilidade de silenciamento (Jiang et al., 2018). Diversos grupos têm usado promotores de planta para expressão transgênica tais como *Actin 2* de *A. thaliana* (An et al., 1996), *Actin 1* de arroz (Tu et al., 2000), *Ubiquitin 1* de milho (Zha et al., 2011) e *UbiU4* de *Nicotiana sylvestris* (Plesse et al., 2001).

O real benefício do uso destes promotores é a possibilidade de presumir a presença de fatores de transcrição correspondentes. Logo os padrões de transcrição também podem ser entendidos. Dada a importância do controle da expressão para minimizar os efeitos adversos de uma planta transformada, a expressão regulada de transgenes por meio de diversos promotores, especialmente os tecido-específicos e os induzíveis é essencial. Além disso, a avaliação de um amplo espectro de promotores que diferem quanto à habilidade de regular os padrões de expressão, pode aumentar consideravelmente a taxa de sucesso da aplicação na geração de plantas com características desejáveis (Sunkara et al., 2014; Singhal et al., 2015).

Diferente dos promotores constitutivos, os tecido-específicos têm um estrito padrão de regulação da expressão dado pela combinação de elementos regulatórios *in cis* que resultam na expressão do transgene apenas em determinada condição, tecido ou estágio de desenvolvimento. Por meio da especificidade do promotor é possível obter resultados benéficos e, ao mesmo tempo, evitar alterações indesejáveis no fenótipo da planta (Muthusamy et al., 2017; Martignago et al., 2020).

Vários grupos têm estudado diferentes promotores tecido-específicos e grandes avanços já foram relatados tanto em plantas modelo quanto em plantas de importância agrícola (Yong et al., 2019). Este é o caso do promotor tecido-específico do gene *GhAO-like 1* que dirige a expressão em flor e fruto de algodão (Lambret-Frotté et al., 2016) e do promotor LTP7 que mostrou atividade específica em fibra de algodão (Masood et al., 2019). Entretanto, mesmo com esforços de diversos grupos de pesquisa no sentido de isolar e validar promotores, poucos são amplamente utilizados pela agricultura.

Tendo em vista que o algodoeiro é alvo do ataque de diversos insetos-praga, há uma urgência no desenvolvimento de novas estratégias para a geração de genótipos resistentes à múltiplos insetos. Este é sem dúvidas um dos maiores desafios no campo da biotecnologia voltada para esta cultura. E para atender a esta demanda, a identificação e a caracterização de novos promotores que possam conduzir a níveis altos de expressão ao

longo de todo o desenvolvimento da planta com o mínimo de efeitos adversos ou de promotores tecido-específicos é fundamental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* (1996): 107-121.

Barros MALB, Da Silva CRC, Lima LM, Farias FJC, Ramos GA, Santos RC. A review on Evolution of Cotton in Brazil: GM, White, and Colored Cultivars. *Journal of Natural Fibers* (2020).

Bilas R, Szafran K, Hnatuszko-Konka K, Konomowicz AK. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2016) 127: 269-287.

Dubey NK, Gupta K, Yadav P, Panigrahi J, Gupta AK. Transgenic Strategies to Develop Resistant Plant Against the Pathogen and Pest. In: Srivastava PK, Singh VP, Singh A, Tripathi DK, Singh S, Prasad SM, Chauhan DK (eds). *Pesticides in Crop Production: Physiological and Biochemical Action*. John Wiley & Sons (2020) 259-290.

Erpen L, Tavano ECR, Harakava R, Dutt M, Grosser JW, Piedade SMS, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA. Isolation, characterization, and evaluation of three *Citrus sinensis*- derived constitutive gene promoters. *Plant Cell Reports* (2018) 37: 1113-1125.

Fang DD. General Description of Cotton. In: Fang DD (ed). *Cotton Fiber: Physics, Chemistry and Biology*. Springer (2018) 1-11.

Firoozabady, E, DeBoer DL, Merlo DJ, Halk EL, Amerson LN, Rashka KE, Murray EE. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* (1987) 10: 105-116.

Flachs, A Transgenic cotton: high hopes and farming reality. *Nature plants* (2017) 3: 16212.

- Han YJ, Kim YM, Hwang OJ, Kim JI. Characterization of a small constitutive promoter from Arabidopsis translationally controlled tumor protein (*AtTCTP*) gene for plant transformation. *Plant Cell Reports* (2015) 34:265–275.
- Hernandez-García C, Finer JJ. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* (2014) 217-218: 109-119.
- Hussain B, Mahmood S. Development of Transgenic Cotton for Combating Biotic and Abiotic Stresses. In: Ahmad S, Hasanuzzaman M (eds). *Cotton Production and Uses*. Springer (2020) 527-545.
- ISAAA (2020) GM Approval Database. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/advsearch/default.asp?CropID=7&TraitTypeID=Any&DeveloperID=Any&CountryID=BR&ApprovalTypeID=Any>. Acessado 23 Mar 2020.
- James C. Brief 54: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2018. ISAAA Brief, New York: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Jiang P, Zhang K, Ding Z, He Q, Li W, Zhu S, Cheng W, Zhang K, Li K. Characterization of a strong and constitutive promoter from the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene *AtSCPL30* as a potencial tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnology* (2018) 18: 1-13
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* (1999) 17:287–291.
- Klumper W, Qaim M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS ONE* (2014) 9: 1-7.
- Lambret-Frotté J, Artico S, Nardeli SM, Fonseca F, Oliveira-Neto OS, Grossi-de-Sá MF, Ferreira MA. Promoter isolation and characterization of *GhAO-like 1*, a *Gossypium hirsutum* gene similar to multicopper oxidases that is highly expressed in reproductive organs. *Genome* (2016) 1: 23-36.
- Macedo LLP, Junior JDAS, Coelho RR, Fonseca FCA, Firmino AAP, Silva MCM, Fragoso RR, Albuquerque EVS, Silva MS, Almeida Engler J, Terra WR, Grossi-de-Sá MF. Knocking down *chitin synthase 2* by RNAi is lethal to cotton boll weevil. *Biotechnology Research & Innovation* (2017) 1: 72-86.

Magalhães DM, Borges M, Laumann RA, Woodcock CM, Pickett JA, Birkett MA, Blassioli-Moraes MC. Influence of two acyclic homoterpenes (Tetranorterpenes) on the foraging behavior of *Anthonomus grandis* Journal of Chemical Ecology (2016) 42:305-13.

Martignago D, Rico-Medina A, Blasco-Escámez D, Fontanet-Manzaneque JB, Caño-Delgado AI. Drought resistance by engineering plant tissue-specific responses. Frontiers in Plant Science (2020) 10: 1-19

Masood A, Mubeen H, Iqbal N. Sequence analysis and expression study of LTP7 promoter isolated from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences (2019) 62: 148-158.

Miranda JE e Rodrigues SMM. História do bicudo no Brasil. In: Belot JL (ed) O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Instituto Mato-grossense do Algodão (2015) 9-46.

Mishiba K-I, Nishihara M, Nakatsuka T, Abe Y, Hirano H, Yokoi T, Kikuchi A, Yamamura S. Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. The Plant Journal (2005) 44:541-556.

Muthusamy SK, Sivalingam PN, Sridhar J, Singh D, Haldhar SM, Kaushal P. Biotic stress inducible promoters in crop plants – a review. Journal of Agriculture and Ecology (2017) 4: 14-24

Observatory of Economic complexity. Raw cotton trade. (2019) <https://oec.world/en/profile/hs92/5201/>. Acessado 12 Jan 2019.

Okumura A, Shimada A, Yamasaki S, et al. CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. Plant Cell Reports (2016) 35: 43-51.

Oliveira RS, Oliveira-Neto OB, Moura HFN, Macedo LLP, Arraes FBM, Lucena WA, Lourenço-Tessutti IT, Barbosa AAD, Silva MCM, Grossi-de-Sá MF. Transgenic Cotton Plants Expressing Cry1Ia12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). Frontiers in Plant Science (2016) 7: 1-11.

Peremarti A, Twyman RM, Gómez-Galera S, Naqvi S, Farré G, Sabalza M, Miralpeix B, Dashevskaya S, Yuan D, Ramessar K, Christou P,

Zhu C, Bassie L, Capell T. Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Molecular Biology* (2010) 73: 363-378.

Plesse B, Criqui M, Durr A, Parmentier Y, Fleck J, Genschik P. Effects of the polyubiquitin gene Ubi.U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* (2001) 45: 655–667.

Ribeiro TP, Basso MF, Carvalho MH, Macedo LLP, Silva DML, Lourenço-Tessutti IT, Oliveira-Neto OB, Campos-Pinto ER, Lucena WA, Silva MCM, Tripode BMD, Abreu-Jardim TPF, Miranda JE, Alves-Ferreira M, Morgante CV, Grossi-de-Sá MF. Stability and tissue-specific Cry10Aa overexpression improves cotton resistance to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research & Innovation* (2020) 1-15.

Rolim GG, Arruda LS, Torres JB, Barros EM, Fernandes MG. Susceptibility of cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) to Spinosyns. *Journal of Economic Entomology* (2019) 112: 1688-1694.

Salvador R, Príncipi D, Berretta M, Fernández P, Paniago N, Sciocco-Cap A, Hopp E J. Transcriptomic survey of the midgut of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Science* (2014) 14:219.

Somssich M. A short history of the CaMV 35S promoter. *PeerJ Preprints* (2019) 7: 1-21.

Stiff MR, Tuttle JR, Graham BP, Haigler CH. Cotton Fiber Biotechnology: Potential Controls and Transgenic Improvement of Elongation and Cell Wall Thickening. In: Ramawat K, Ahuja M (eds) *Fiber Plants. Sustainable Development and Biodiversity*. Springer, vol 13 (2016) 127-153.

Shahmuradov IA, Umavoc RK, Solovyev VV. TSSPlant: a new tool for prediction of Plant Pol II promoters. *Nucleic Acids Research* (2017) 45: e65.

Singhal P, Jan AT, Azam M, Haq QMR. Plant abiotic stress: a prospective strategy of exploiting promoters as alternative to overcome the escalating burden. *Frontiers in Life Science* (2016) 9: 52-63.

Sunkara S, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK. Isolation and Functional Characterization of a novel seed-specific promoter region from peanut. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2014) 172:325-39.

Tarazi R, Jumenez JLS, Vaslin MFS. Biotechnological solutions for major cotton (*Gossypium hirsutum*) pathogens and pests. *Biotechnology Research and Innovation* (2020) 1-8.

Tu J, Zhang G, Datta K, Xu C, He Y, Zhang Q, Khush GS, Datta SK. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis*-endotoxin. *Nature Biotechnology* (2000) 18: 1101–1104.

Umbeck, P, Johnson G, Barton K, Swain W. Genetically Transformed Cotton (*Gossypium Hirsutum* L.) Plants. *Nature Biotechnology* (1987) 5: 263–266.

Zha W, Peng X, Chen R, Du B, Zhu L, He G. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plant-mediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One* (2011) 6: e20504.

Wang M, Sun R, Zhang B, Wang Q. Pollen Tube Pathway-Mediated Cotton Transformation. In: Zhang B. (ed). *Transgenic Cotton. Methods in Molecular Biology*, Humana Press vol 1902 (2019) 67-73.

Yong J, Xiao Qing L, Hai Yang J, Ru Mei C. Research advances of plant tissue specific promoters. *JASTA* (2019) 21:18-28.

JUSTIFICATIVA

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é considerada uma das pragas mais destrutivas do cultivo de algodão, com alta incidência durante o período de transição entre a floração e a frutificação e pode gerar prejuízos que chegam a comprometer 100% da produção devido aos danos causados em botões florais, o que reduz significativamente a qualidade da fibra. A inserção de genes de resistência ao bicudo é a alternativa com maior potencial de controle desta praga e pode permitir o cultivo de algodoeiro mesmo em ambientes considerados desfavoráveis, o que possibilita o aumento dos níveis de produtividade.

Na obtenção da planta transformada com as características desejadas, o promotor é essencial para o controle da expressão do transgene. Neste sentido, a busca por novas fontes de promotores, sejam constitutivos, tecido-específico ou induzíveis, pode auxiliar na geração de cultivos resistentes a insetos-praga e, conseqüentemente, representar aumento da produtividade do algodoeiro.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar novos promotores que possam ser usados na transformação genética de algodão visando alta eficiência na geração de plantas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro.

Objetivos específicos

- Caracterizar a atividade do promotor do gene *act 2* de *A. thaliana* em flores e frutos de algodoeiro ao longo do desenvolvimento.
- Caracterizar, por método histoquímico, promotores isolados de dez genes tecido-específicos de algodoeiro por avaliação em planta modelo, *A. thaliana*.
- Avaliar, por método histoquímico, a atividade dos dez promotores caracterizados em *A. thaliana* na planta alvo *G. hirsutum*.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS DA TESE

Os resultados desta tese estão divididos em dois capítulos. O primeiro referente à caracterização funcional do promotor do gene *act2* de *A. thaliana* em tecidos reprodutivos de algodoeiro e que deu origem ao artigo intitulado “**Functional characterization of the *Arabidopsis actin 2* promoter in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) flowers and bolls**” (Anexo 1). E o segundo referente à caracterização de dez novos promotores tecido-específicos em tecidos de algodoeiro.

CAPÍTULO 1

Caracterização funcional do promotor do gene *act 2* de *Arabidopsis thaliana* em flores e frutos de algodão (*Gossypium hirsutum*)

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas inovativas têm sido desenvolvidas no intuito de contribuir para o suprimento das demandas globais de produção de algodão com foco no aumento da produtividade e da qualidade da fibra assim como a tolerância a estresses bióticos e abióticos (Zaib et al., 2020). Esforços têm sido feitos na tentativa de gerar algodão GM com ênfase na resistência a insetos praga visando a redução do uso de inseticidas que resulta na conservação dos agentes de controle biológico e na redução de efeitos negativos em insetos não-alvo (Shahid et al., 2019).

O desenvolvimento de organismos transgênicos é baseado em métodos que envolvem o controle da expressão gênica, ou seja, o resultado da interação entre fatores transcricionais e sequências de elementos regulatórios *in cis*. Os promotores desempenham uma função chave neste processo, regulando a efetividade e a intensidade da transcrição do gene alvo, de forma a alcançar o fenótipo e, por consequência, o produto desejado (Pandey et al., 2019). Vários promotores constitutivos provenientes de plantas e de vírus já foram encontrados, entretanto poucos são validados na planta-alvo e caracterizados em diferentes tecidos ou estágios de desenvolvimento (Basso et al., 2020).

A actina é um componente fundamental do citoesqueleto e essencial para todas as células de eucariotos. Ela compõe estruturas do microfilamento por meio da auto polimerização e interações com várias outras proteínas. O genoma de *Arabidopsis* contém oito genes funcionais de actina (Volkman e Baluska, 1999). Os genes *act2* e *act8* têm um padrão de expressão forte e constitutiva em tecidos vegetativos (An et al., 1996). O promotor do gene *act 2* dirige altos níveis de expressão tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (He et al., 2009; Manna et al, 2016; Pereira et al, 2019). Em ensaio realizado com *Arabidopsis* transgênica, An e Meagher (2010) observaram que a expressão foi alta em folha, raiz e caule e que o padrão de expressão transiente refletiu o padrão de expressão estável.

Este estudo realizou a caracterização funcional do promotor do gene *Act 2* em flor e fruto de algodoeiro durante seu desenvolvimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizadas sementes de algodão (variedade 7MH) transformadas via biobalística. Os processos de transformação, cultivo *in vitro*, seleção e aclimação das plantas foram realizadas anteriormente e estão descritos em Aragão et al. (2005). Neste estudo foram apenas realizados ensaios histoquímicos.

Os vetores plasmidiais utilizados foram: pAG1 contendo o gene *gus* sob controle do promotor *act2* (1402 pb; NCBI Sequence ID: gi | 332.640.072 | CP002686.1, posição 6.475.534 a 6.475.133) de *A. thaliana* (*act2::gus*) (Figura 1) e pAHAS35SGUS contendo o gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S (*CaMV35S::gus*) (Figura 2). Ambos os vetores contêm o cassete de expressão do gene *ahas* que confere tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinonas.

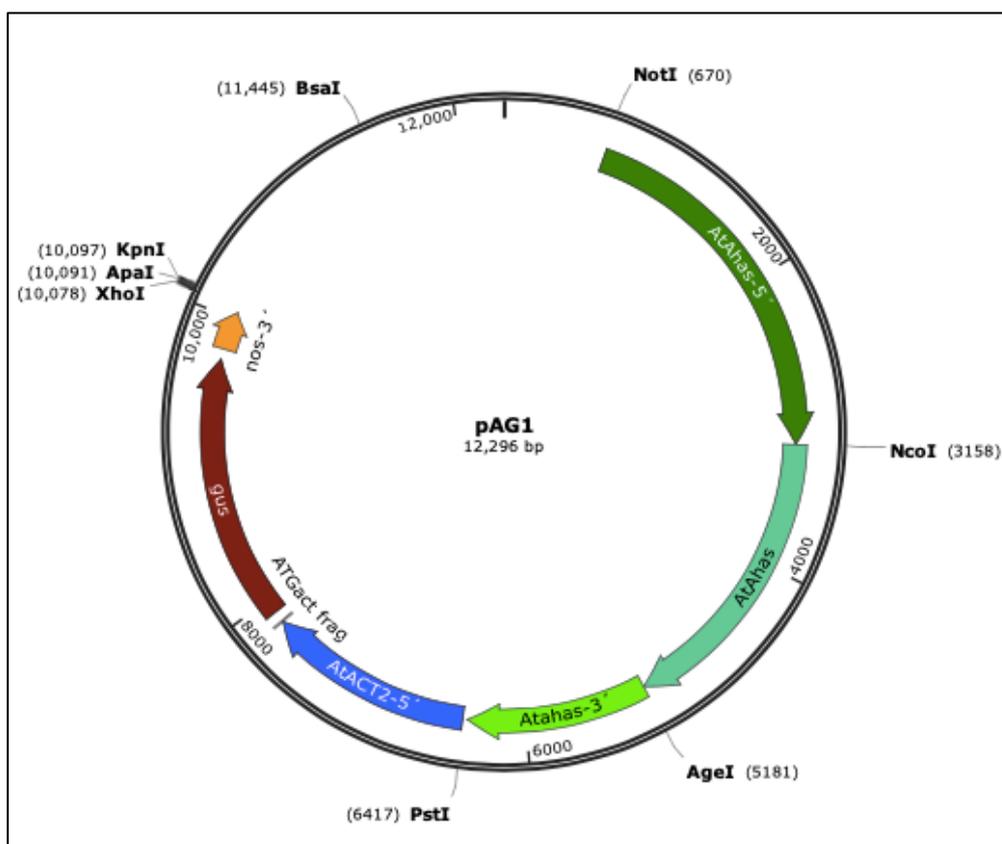


Figura 1. Representação esquemática do vetor pAG1 com o gene *gus* sob controle do promotor *act2*.

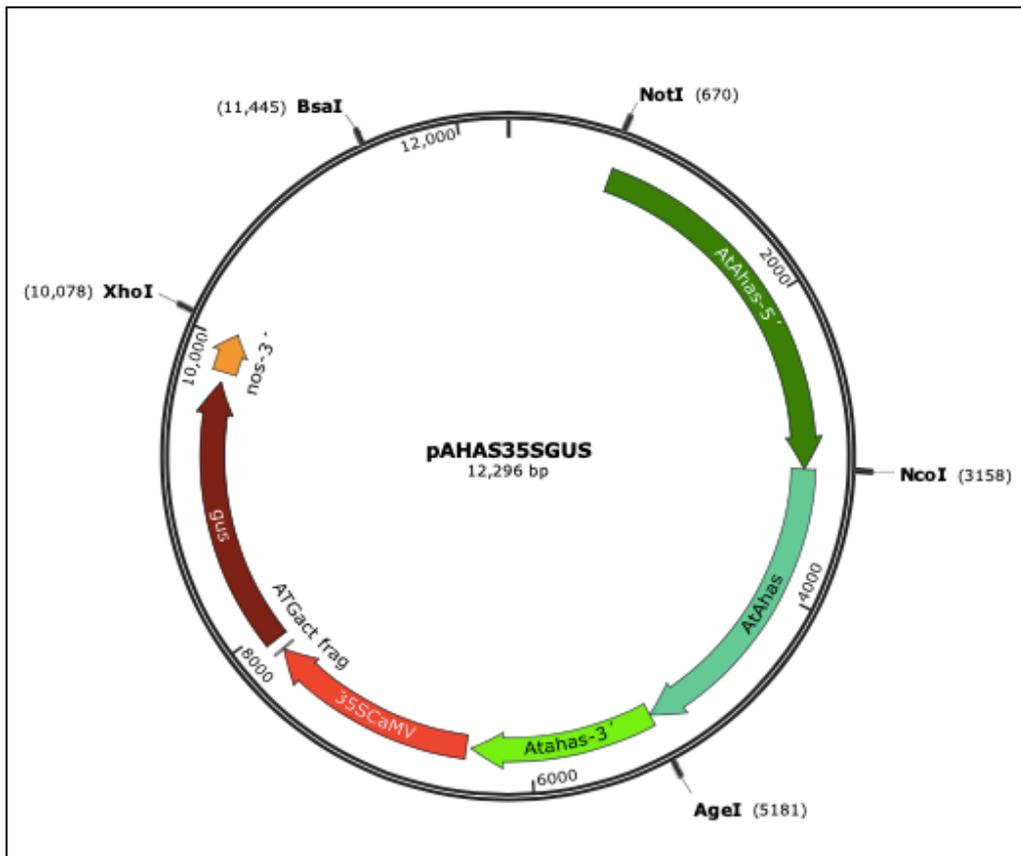


Figura 2. Representação esquemática do vetor pAHAS35SGUS com o gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S.

Plantas homocigotas da linhagem 20/4 (transformada com o vetor pAG1) foram identificadas na geração T₂ e cultivadas em casa de vegetação até a geração T₄. Destas plantas foram coletadas aleatoriamente amostras (em triplicata) de flores e frutos de algodoeiro em diferentes estágios de desenvolvimento que, posteriormente, foram seccionadas a mão e incubadas em solução de X-gluc a 37°C por 12 horas. Após este período, a solução foi retirada e as amostras foram armazenadas em etanol 70% para descoloração e preservação. Como controle negativo cada tecido foi posicionado na placa de bombardeamento apenas aplicando o vácuo (27 mmHg) no equipamento de aceleração de micropartículas recobertas com o DNA plasmidial (*genegun*) pelo tempo em que ficaria submetido para o bombardeamento (dados não apresentados – nenhum dos tecidos controle apresentou expressão).

A expressão do gene *gus* foi quantificada por método fluorimétrico, de acordo com Sunilkumar et al. (2002). Utilizou-se dez plantas homocigotas de três linhagens independentes e tecidos de folha, raiz, fibra e pétalas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises mostraram que a atividade do promotor act2 foi semelhante à atividade do promotor CaMV35S em folhas e raízes (Figura 3). Entretanto, plantas transformadas com o cassete act2::gus tiveram níveis mais altos de expressão em tecidos reprodutivos quando comparado às que foram transformadas com o cassete CaMV35S::gus. Em pétala foi 2,7 vezes maior e em fibra 2,3 vezes maior (Figura 3).

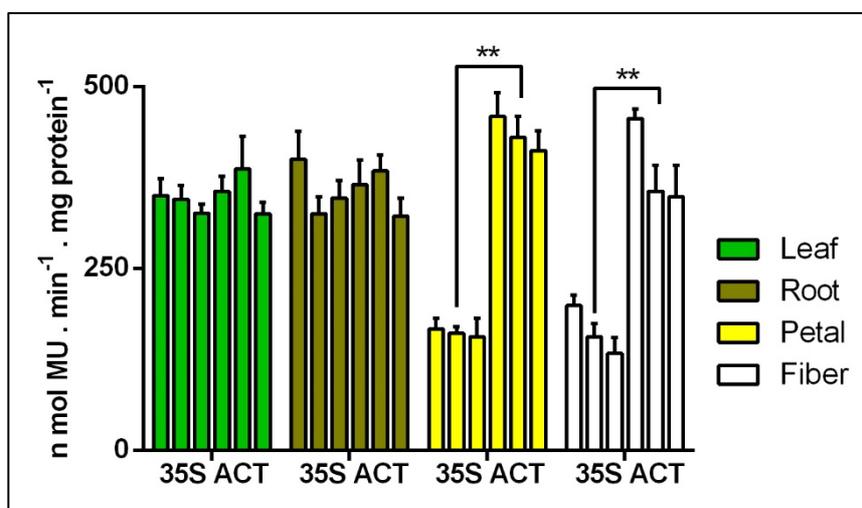


Figura 3. Ensaio quantitativo da atividade específica de GUS em folhas, raízes, pétalas e fibra de algodoeiro com o gene gus dirigido pelos promotores CaMV35S (35S) e act2 (ACT).

** $P < 0.01$, $n = 30$ (média dentro do grupo 35S ou ACT).

As análises histoquímicas mostraram ainda que o promotor act2 mostrou-se forte em todos os tecidos florais, incluindo pólen, pétalas e óvulos (Figura 4). Durante todo o período de desenvolvimento das flores – dos 18 aos 5 dias pré-antese e na antese, foi observada expressão forte em tecidos florais, identificada pela intensa coloração azul, como pode ser observado na Figura 4.

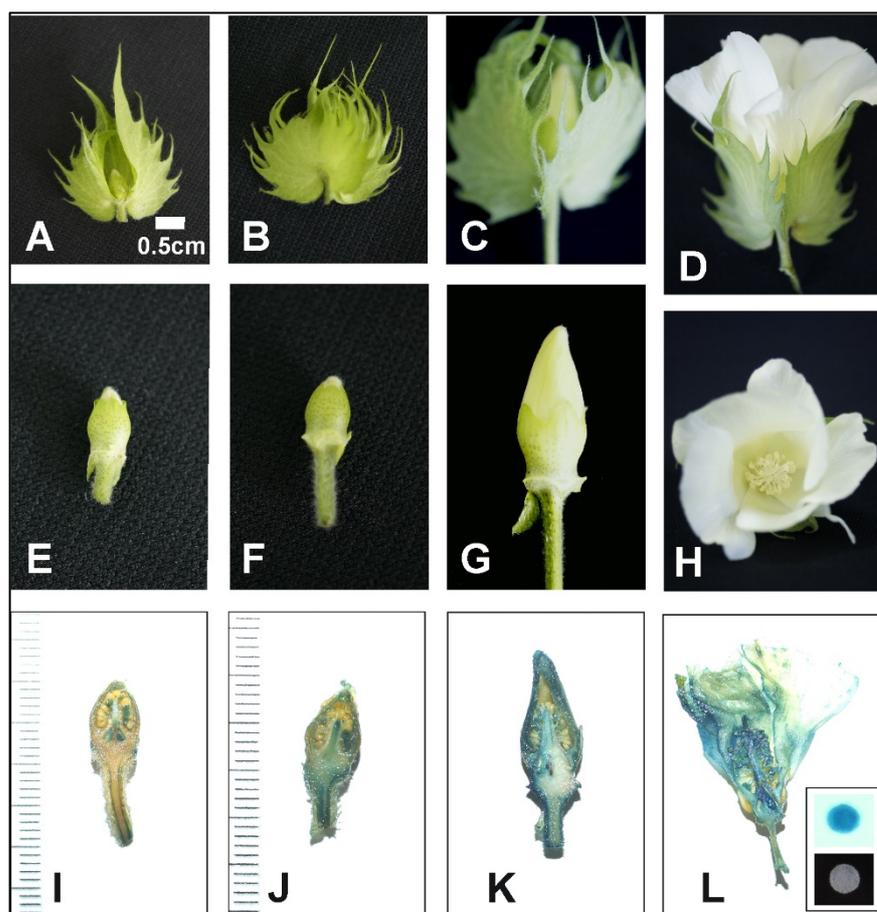


Figura 4. Expressão do gene *gus* dirigido pelo promotor *act2* em algodão transgênico (geração T₄) em tecidos florais.

*A barra da figura A representa a escala em todas as figuras, exceto a caixa menor em detalhe da figura L.

A expressão dos genes para controle do bicudo-do-algodeiro em micrósporos e grãos de pólen é importante para o desenvolvimento de medidas de controle eficazes, tendo em vista que o desenvolvimento reprodutivo de fêmeas do bicudo é diretamente ligado à alimentação no botão floral (Paula et al., 2013). Pode-se observar na Figura 5, a atividade do gene *gus* em todos os estágios de desenvolvimento do fruto do algodoeiro (de 3 a 33 dias pós antese), especialmente na região da fibra (Figura 5 F-H). Isto sugere que o promotor *act2* pode ser usado em estudos de desenvolvimento da fibra e na manipulação genética para melhoramento da qualidade da fibra. A produção de fibra e a qualidade são os dois principais fatores que determinam o lucro de produtores de algodoeiro e, por consequência, são críticos para a indústria têxtil (Constable et al., 2015).



Figura 5. Atividade do gene *gus* dirigida pelo promotor *act2* em frutos de algodão transgênico (geração T₄).

Os resultados apresentados também revelam potencial para uso do promotor *act2* no controle da expressão de genes envolvidos com a resistência ao bicudo-do-algodoeiro. O promotor foi ativo nos mesmos tecidos que o bicudo utiliza para ovopositar e alimentar-se durante todo o ciclo de vida. Bem como o bicudo, várias outras pragas causam prejuízos ao algodoeiro, o que torna o promotor *act2* uma boa alternativa para uso na transformação genética.

5 CONCLUSÃO

O promotor *act2* de *A. thaliana* mostrou alta e constitutiva atividade nos diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento do algodoeiro avaliados. Há, portanto, potencial alternativa de uso em construções de engenharia genética de algodoeiro que visem aumento da qualidade da fibra e resistência à insetos-praga que atingem a fase reprodutiva, em especial, o bicudo-do-algodoeiro que oviposita e se alimenta de estruturas florais causando elevados níveis de prejuízo.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aragão FJL, Vianna GR, Carvalheira SBRC, Rech EL. Germ line genetic transformation

in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule Plant Science (2005): 1227-1233.

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. The Plant Journal (1996): 107-121.

An YQ e Meagher RB. Strong expression and conserved regulation of ACT2 in *A. thaliana* and *Physcomitrella patens*. Plant Molecular Biology Reporter (2010): 481-490.

Basso MF, Lourenço-Tessutti I, Busanello C, Pinto CEM, Freitas EO, Ribeiro TP, Engler JA, Oliveira AC, Morgante CV, Ferreira MA, Grossi-de-Sá MF. Insights obtained using different modules of the cotton *uceA 1.7* promoter. Planta (2020) 251-256.

Constable G., Llewellyn D., Walford S.A., Clement J.D. Cotton Breeding for Fiber Quality Improvement. In: Cruz V.M.V., Dierig D.A. (eds) Industrial Crops. Handbook of Plant Breeding, vol 9. Springer (2020): 191-232.

He C, Lin Z, McEroyt D, Wu R. Identification of the rice Actin2 gene regulatory region for high-level expression of transgenes in monocots. Plant Biotechnology Journal (2009): 227-239.

Manna M, Achary MM, Islam T, Agrawal PK, Reddy MK. The development of phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice. Scientific Reports (2016): 24941.

Pandey B, Prakash P, Verma PC, Srivastava R. Chapter 10 - Regulated gene expression by synthetic modulation of the promoter architecture in plants. In: Singh SP, Pandey A, Du G, Kumar S. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier (2019) 235-255.

Paula DP, Claudino D, Timbó RV, Miranda JE, Bemquerer MP, Ribeiro AC, Sujii ER, Fontes EMG, Pires CSS. Reproductive dormancy in boll-weevil from populations of the Midwest of Brazil (2013) Journal of Economic Entomology 106: 86-96.

Pereira BM, Guimaraes LA, Souza NOS, Saraiva MAP, Guimaraes PM, Brasileiro ACM. Overexpression of wild *Arachis* lipocalin enhances root-knot nematode resistance in peanut hairy roots. *Plant Molecular Biology Reporter* (2019): 74-86.

Shahid, M.R., M. Shakeel, M. Farooq, S. Ahmad and A. Mahmood, Tritrophic association between Bt cotton, arthropod pest and natural enemies. In: *Advances in Cotton Research*. Intech Open (2019) 1-16.

Sunilkumar G, Connell JP, Smith CW, Reddy AS, Rathore KS. Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, arabidopsis, and tobacco. *Transgenic Research* (2002) 347-359.

Volkman D e Baluska F. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks. *Microscopy Research and Technique* (1999): 135-154.

Zaib P, Iqbal M, Shahzadi R, Muhammad H, Rasool B, Khan SA, Ansari MR. Introductory Chapter: Recent Trends in “Cotton Research”. In: Rahman MU. *Advances in cotton research*. IntechOpen (2020): 1-7.

CAPÍTULO 2

Caracterização funcional de dez promotores tecido-específicos em *A. thaliana* e avaliados em algodão (*G. hirsutum*)

1 INTRODUÇÃO

A fibra do algodoeiro é considerada a mais importante para a indústria têxtil. Aproximadamente 25 milhões de toneladas de algodão são produzidas anualmente, o que resulta em um impacto econômico de, pelo menos, 600 bilhões de dólares ao redor do mundo (Khan et al., 2020). Neste contexto, o Brasil é atualmente um dos principais produtores de algodão. São produzidas entre 1 e 1,3 milhões de toneladas de fibra de algodão, o que é suficiente para atender à demanda interna e exportar o volume excedente (Barros et al., 2020).

A despeito deste fato, vários aspectos da produção e do processamento de algodão ainda carecem de pesquisa. Uma forte questão é a quantidade de pesticida aplicada nas lavouras para controle de pragas. É estimado que 25% do uso de inseticidas em todo o mundo seja destinado apenas para o cultivo de algodão (Anees e Shad, 2020). Face a isto, várias alternativas têm sido estudadas no intuito de encontrar soluções com menor custo para o produtor e menos nocivas ao meio ambiente. A mais promissora é o desenvolvimento de cultivares geneticamente modificadas e que sejam resistentes às mais importantes pragas. Atualmente, aproximadamente 56% das cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento são GM, o que resulta em significativo ganho de produtividade (MAPA, 2020).

Entretanto, tanto o processo de transformação quanto o de regeneração de algodão são dispendiosos e com baixa taxa de sucesso (Iqal et al., 2017). E neste sentido, promotores adequados são cruciais para a regulação da expressão de transgene no perfil desejado, promovendo assim o sucesso da aplicação da tecnologia transgênica (Zhang et al., 2016). Por isso, um esforço coletivo tem sido feito no intuito de encontrar novos e eficientes promotores que mostrem uma expressão consistente, especialmente os tecido-específicos que podem desempenhar um importante papel neste sentido (Masood et al., 2020).

Portanto, este estudo buscou caracterizar novos promotores tecido-específicos para a utilização em vetores de transformação que visam a resistência ao bicudo-do-algodoeiro, principal praga desta cultura e ainda sem uma medida eficaz e durável de controle.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira, que englobou a busca e escolha dos promotores avaliados, foi executada pelo IMAmt em cooperação com a Evogene, uma empresa de biologia computacional com foco no suporte para desenvolvimento de produtos na área da ciência da vida por meio de sua plataforma de predição que une grandes bancos de dados à inteligência artificial.

A segunda etapa, de caracterização histoquímica dos promotores em *A. thaliana*, espécie modelo e, em avaliação em *G. hirsutum*, espécie-alvo, foi realizada na Embrapa Cenargen em nosso grupo de trabalho. A primeira etapa do trabalho está descrita apenas para auxiliar no entendimento e discussão dos resultados da segunda etapa.

2.1 Escolha de promotores

Plantas de *G. hirsutum* de quatro linhagens distintas do IMAmt (IMA 6035, IMA 8276, IMA 1724 e IMA 2059) foram utilizadas neste estudo. A escolha dos tecidos de interesse foi baseada nos hábitos de alimentação e reprodução do bicudo-do-algodoeiro. Foram coletados botões florais em dois estágios (início do desenvolvimento (Figura 1A) e de tamanho médio (Figura 1B), flor branca (ainda não fecundada) (Figura 1D), pólen - mix do botão floral no final do desenvolvimento (Figura 1C) e da flor branca) e maçãs com 18 (Figura 2A) e 25 DAP (dias após a fecundação) (Figura 2B). Todos os tecidos foram amostrados em triplicatas e armazenados no mesmo tubo. Todas as estruturas foram seccionadas em pedaços entre 0,5 e 1 cm, armazenadas de forma individualizada contendo RNA Later (Ambion) e enviadas para a Evogene em gelo seco.

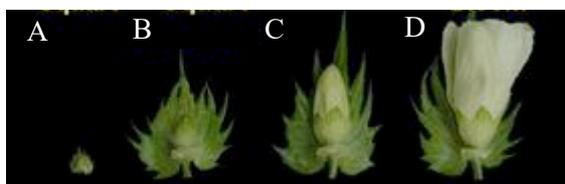


Figura 1. Estágios dos botões florais de algodoeiro coletados no início do desenvolvimento (A), com tamanho médio (B), botão floral na fase final de desenvolvimento (C) e flor branca não fecundada (D). Rechie et al., 2004.

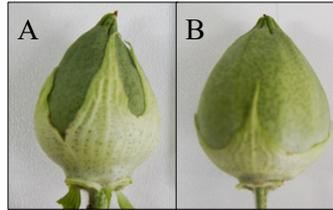


Figura 2. Estágios de frutos de algodoeiro coletados com 18 (A) e 25 (B) dias após a polinização no IMAmt.

Após recebidas na Evogene, as amostras foram submetidas à extração de RNA e posteriormente analisadas por meio da plataforma RePack (Regulation Package). Para isto, as sequências foram inseridas em quatro plataformas de análise de expressão gênica: Affymetrix, Agilent, RNAseq e o banco interno da Evogene. A partir dos resultados e baseado no pressuposto de que cada gene produz um perfil de expressão específico, os dados foram marcados de acordo com a sua expressão por tecido/órgão e por estágio de desenvolvimento em cada uma das plataformas. A partir desta separação, combinaram-se múltiplos perfis de expressão por cultivo, por plataforma e por hibridização resultando assim um banco de dados geral com todas as informações de expressão por plataforma, agrupados por marcação de tecido/órgão e estágio de desenvolvimento.

Em seguida foi realizada *Plot-component analysis* (PCA) com distribuição multi-dimensional das amostras por níveis de expressão gênica. O agrupamento foi feito por tipo de tecido – flor, pólen, folha e raiz em cada um dos grupos marcados na etapa anterior. Realizou-se também um refinamento para descartar amostras que apresentavam perfis de expressão divergentes entre as plataformas e uma revisão dos grupos marcados para atingir a resolução máxima.

Os dados resultantes da plataforma RePack permitiram a classificação de potenciais promotores baseada na predição de em quais tecidos/órgãos a expressão pode ser benéfica e em quais é indesejada, tanto em relação ao tecido/órgão quanto em relação ao estágio de desenvolvimento. Vale ressaltar que foram estabelecidos como preferenciais os promotores provenientes de genes identificados em algodão. Baseado nestes dados e tendo como pressuposto que o foco era a alta e constante expressão em tecidos reprodutivos atacados pelo bicudo-do-algodoeiro, quatro pesquisadores do

IMAmt e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia escolheram, de forma heurística, 10 potenciais promotores. A avaliação foi feita com base em seis critérios: espécie em que o gene foi identificado, tamanho do promotor, confiabilidade da sequência, expressão ao longo do desenvolvimento, expressão com a maturação do pólen e expressão em raiz. Os pesquisadores atribuíram notas de 1 a 5, em que 1 representava o mais indesejável e 5 o mais desejável. Por ser utilizada avaliação heurística, nenhuma das notas representou valor absoluto. Foram escolhidos e posteriormente sintetizadas sequências dos promotores IMA 001, IMA 006, IMA 010, IMA 014, IMA 017, IMA 025, IMA 027, IMA 029, IMA 030 E IMA 036 (Devido a questões de propriedade intelectual, os nomes dos promotores não foram apresentados na versão inicial desta tese. Entretanto, após a resolução destas questões, os detalhes serão tornados públicos).

2.2 Vetores de expressão

2.2.1 Arabidopsis thaliana

A fim de avaliar a expressão do gene repórter *gus* (que codifica para a enzima β -glucuronidase) dirigido por todos os promotores escolhidos em diferentes tecidos de *A. thaliana* foram construídos 10 vetores. Para cada vetor, o cassete de expressão CaMV35S-*gus*-nos foi retirado do vetor pBI121 (Chen et al., 2003) pela digestão com as enzimas de restrição HindIII e EcoRI. O fragmento obtido foi ligado nos sítios HindIII e EcoRI do vetor pUC19 (Norrander et al., 1983) resultando no vetor pUC35SGUS. Os promotores gerados foram clonados individualmente no vetor pCAMBIA3301 (CAMBIA, Austrália) nos sítios SbfI e NcoI substituindo o promotor CaMV35S e gerando cada um dos 10 vetores a serem testados: pC3301IMA001pro (Figura 3) a pC3301IMA036pro.

Os vetores contêm o gene repórter *gus*, o gene de seleção *bar* que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio sob controle do promotor constitutivo CaMV35S e o gene de resistência a canamicina. Como controle foram utilizados os vetores pCAMBIA3300 (sem o gene *gus*) e pCAMBIA3301 (com o promotor constitutivo CaMV35S regulando o gene *gus*). Cada vetor gerado foi transferido para a linhagem de *A. tumefaciens* GV3101 que foi utilizada para transformar *A. thaliana*.

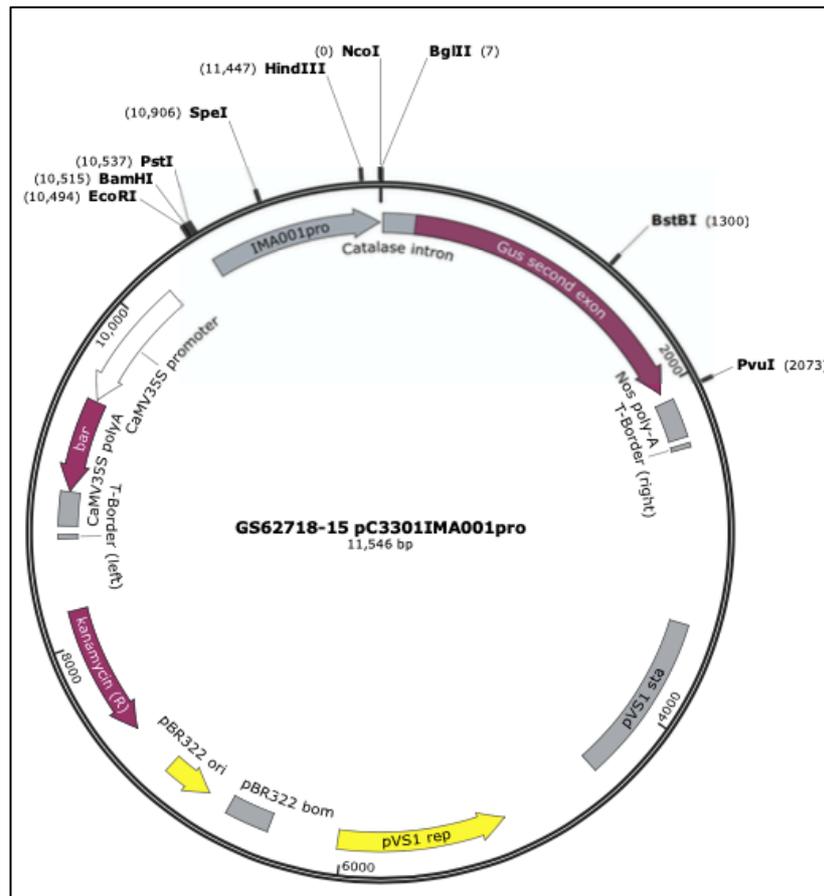


Figura 3. Representação esquemática do vetor pC3301IMA001pro com o gene *gus* sob controle do promotor IMA001.

2.2.2 *Gossypium hirsutum*

O padrão de expressão em *A. thaliana* foi avaliado em tecidos de algodoeiro. Para isto foram construídos vetores a partir do vetor pUC35SGUS com os mesmos promotores usados na transformação de *A. thaliana*. Entretanto, em *G. hirsutum*, os promotores gerados foram clonados individualmente no vetor pUC35SGUS nos sítios SbfI e SmaI substituindo o promotor CaMV35S e gerando cada um dos 10 vetores a serem testados: pIMA001proGUS (Figura 4) a pIMA036proGUS. Os vetores contêm o gene repórter *gus* e o gene de resistência a ampicilina, utilizado para selecionar bactérias no processo de clonagem em *Escherichia coli*. Como controle positivo foi usado o mesmo vetor com o gene *gus* regulado pelo promotor constitutivo CaMV35S. Como controle negativo cada tecido foi posicionado na placa de bombardeamento apenas aplicando o vácuo (27 mmHg) no equipamento de aceleração de micropartículas recobertas com o DNA plasmidial (*genegun*) pelo tempo em que ficaria submetido para o bombardeamento.

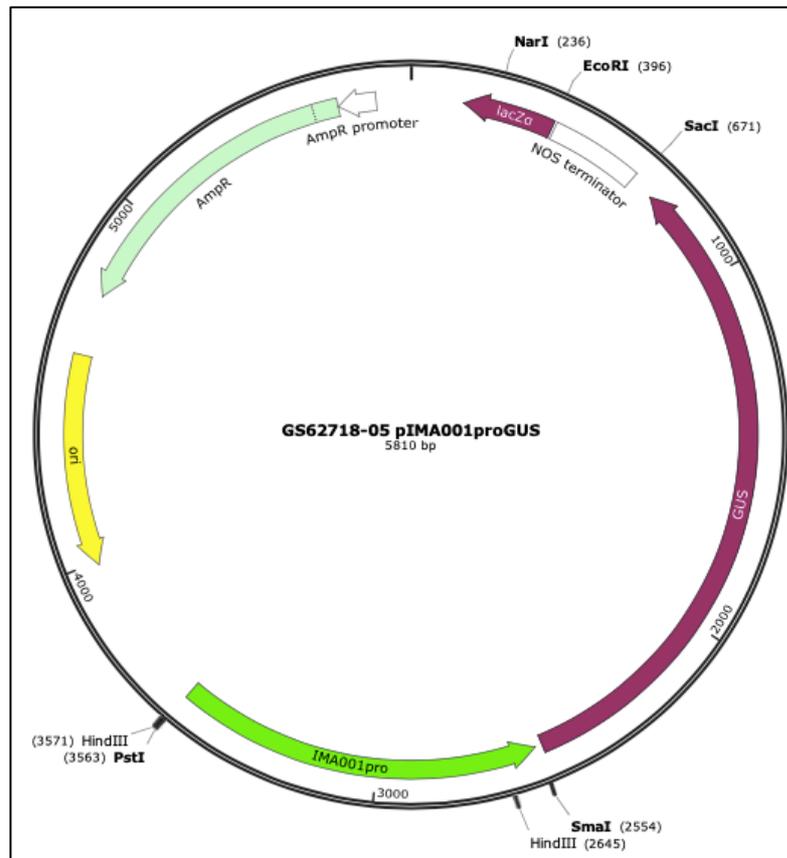


Figura 4. Representação esquemática do vetor pIMA001proGUS com o gene *gus* sob controle do promotor IMA001

2.3 Material vegetal e ensaios de expressão

Sementes de *A. thaliana* da cultivar Columbia Col-0 foram germinadas em vasos de 10 cm de diâmetro com solo adubado (Figura 4A). Após três semanas as plântulas foram individualizadas em novos vasos (Figura 5B e C) e cultivadas em câmara de crescimento a 22°C sob 12 horas de luz para crescimento vegetativo. Oito semanas após a individualização, as plantas foram submetidas a 16 horas de luz e começaram a desenvolver inflorescências (Figura 5D). Neste momento, foi realizada a transformação via *Agrobacterium* pelo método floral-dip (Zhang et al., 2006) e as plantas permaneceram em sala de cultivo até gerar sementes (Figura 5E).



Figura 5. Cultivo e transformação de *A. thaliana*. A: Plântulas uma semana após o plantio. B: Plântulas três semanas após o plantio e prontas para individualização. C: Plantas individualizadas em crescimento vegetativo. D: Início do desenvolvimento de inflorescências. E: Plantas em câmara de umidade logo após a transformação via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando o método *floral dip*

Sementes provenientes de plantas transformadas (geração T₀) pelo método *floral dip* foram semeadas em vasos com solo adubado com as mesmas características dos que foram utilizados para sementes não transformadas. Para seleção das plantas transformadas foi pulverizada solução contendo 120 mg/L de glufosinato de amônio (GA). Foram realizadas duas aplicações da solução com espaço de uma semana entre elas. As plantas que sobreviveram às aplicações (Figura 6) foram individualizadas e analisadas utilizando o método imunocromatográfico de fluxo lateral que detecta a presença do gene *bar* - Envirologix®. O teste foi realizado com secções de folha maceradas em um tampão fosfato-salino (PBS) 1X.

Dez plantas (geração T₁) de cada construção que foram positivas para o gene *bar*, foram utilizadas para o ensaio de expressão do gene *gus*. Amostras de folhas, inflorescências, sílicas e raízes foram coletadas aleatoriamente de cada uma das dez plantas e incubadas em solução de X-gluc a 37°C por 24 horas. Após este período, a solução foi retirada e as amostras foram armazenadas em etanol 70% para descoloração e preservação. Os tecidos foram fotografados utilizando câmera digital Sony DSLR – A550.

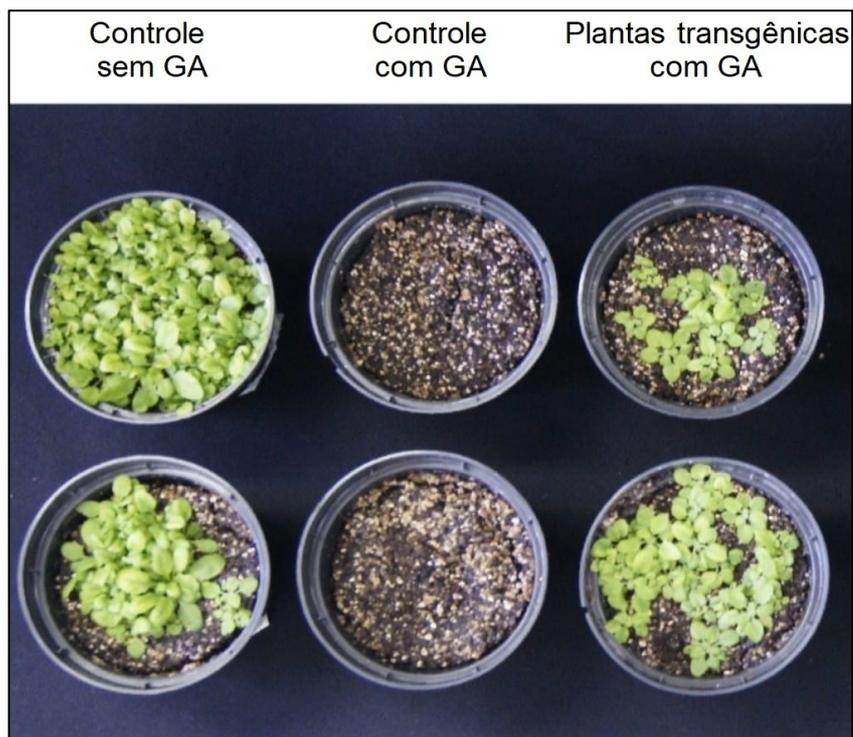


Figura 6. Seleção de plantas transgênicas após a aplicação de glufosinato de amônio (GA) em comparação com tratamento controle com e sem GA.

Para ensaios de expressão transiente em algodão, sementes da variedade Coker foram germinadas em vasos de 5 litros com solo adubado. As plantas permaneceram em casa de vegetação até o início do desenvolvimento dos botões florais. A partir deste momento, amostras de cada tecido foram coletadas em triplicata, escolhidas de forma aleatória, utilizando sempre indivíduos diferentes para cada teste. Os tecidos amostrados estão na Tabela 1.

Tabela 1. Tecidos de algodoeiro utilizados em ensaios de expressão transiente e suas respectivas formas de coleta.

Tecido	Forma de coleta
Folha	Secções de 1,5 x 1,5 cm de folhas jovens
Pecíolo	Secções de 2 cm, coletadas próximo à folha coletada
Radícula	Obtida da semente submersa em água overnight e posteriormente germinada no escuro por quatro dias
Botão floral	Coletados botões de tamanho médio
Flor	Flor branca (período de antese) dissecada em pétala, estigma, antera e ovário
Fruto	Frutos de 10 – 20mm (início do desenvolvimento – 20 DAP) e de 30 mm de diâmetro (fim do desenvolvimento – 42 DAP)
Semente	Semente submersa em água overnight e posteriormente germinada no escuro por quatro dias – separada em endosperma, cotilédone e embrião

Cada tecido de algodoeiro foi transformado via biobalística conforme Aragão et al. (2005) para avaliação da expressão transiente. Os tecidos foram individualmente posicionados em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog, 1962) de modo que a sua superfície fosse ao máximo exposta ao bombardeamento (Figura 7). Cada tecido foi transformado utilizando uma pressão de 27 mmHg e 1200 psi. Após o bombardeamento as placas contendo os explantes foram colocadas em sala de cultivo (24°C sob 12 horas de luz) por 24 horas. Em seguida, cada tecido foi colocado em um microtubo (5 mL) e incubado em solução de X-gluc a 37°C *overnight*. Após este período, a solução foi retirada e as amostras foram armazenadas em etanol 70% para descoloração e preservação. Os tecidos foram fotografados utilizando câmera digital Sony DSLR – A550.



Figura 7. Tecidos de sementes imaturas de algodoeiro posicionados em placa de Petri contendo meio MS para bombardeamento

Com os resultados parciais dos tecidos avaliados e tendo em vista que o principal objetivo foi isolar e caracterizar promotores tecido-específico que pudessem ser utilizados em construções para transformação de plantas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro, foi realizada a avaliação mais detalhada da expressão em semente. Desta vez foram utilizados frutos imaturos em quatro estágios diferentes – 15 mm, 20 mm, 25 mm e 30 mm de diâmetro (Figura 8). A escolha foi baseada na morfologia dos frutos durante o período de 18 a 25 DAP, critério usado na coleta das amostras no IMAmt no início do desenvolvimento deste trabalho. Os promotores IMA 006, IMA 010, IMA 027, IMA 030 e IMA 036 foram escolhidos para este teste. Os controles positivo e negativo utilizados foram os mesmos da primeira etapa.



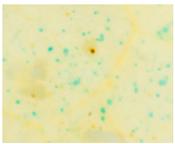
Figura 8. Frutos de algodoeiro em quatro estágios de desenvolvimento (15mm, 20 mm, 25 mm e 30 mm) utilizados para retirada das sementes imaturas testadas quanto ao padrão de expressão do gene *gus* sob controle de diferentes promotores

Para avaliar os tecidos transformados, utilizou-se uma escala de notas que variaram de 0 a 4, em que 0 significa a ausência total de pontos ou área azul e 4 a maior

área azul observada. Cabe ressaltar que a avaliação da antera foi inversa, isto porque um dos critérios utilizados para selecionar promotores foi a não expressão nos grãos de pólen.

Na tabela 2 estão apresentadas as notas e sua respectiva área em cada tipo de tecido: vegetativo, reprodutivo, de fruto e de semente. No fruto foram considerados três tipos de tecido na avaliação: fibra, carpelo e semente, ou seja, quanto maior a área azul em cada um destes tecidos, maior a nota.

Tabela 2. Escala de notas utilizada para avaliação da atividade do gene *gus* em cada tipo de tecido de algodoeiro testado por meio da área azul observada.

	Folha	Botão floral	Antera	Fruto	Cotilédone
0					
1					-*
2					
3	-*		-*		
4					

* Folha, antera e cotilédone tiveram ausência de imagens relacionadas à alguma das notas, isto porque a avaliação de nenhum promotor foi intermediária entre a nota anterior e a posterior.

3. RESULTADOS

3.1 Escolha dos promotores

A partir das amostras de tecidos de algodão enviadas pelo IMA à empresa Evogene (<https://www.evogene.com/>) e após análise nas plataformas de expressão gênica, observou-se que aproximadamente 75% dos dados de interesse foram identificados em três espécies: *A. thaliana*, algodão (*G. hirsutum*) e tomate (*Solanum*

lycopersicum). Ao final, com a identificação dos dados por espécie, tecido e estágio de desenvolvimento, o padrão desejado dos potenciais promotores foi definido e, assim, dois grupos baseados em preferência se formaram (Tabela 2):

1) Tecidos requeridos, subdivididos em dois grupos:

A: Apresentaram alto nível de expressão constitutiva em flor e frutos jovens com até 20 DAP (definidos como tecidos alvo no início do estudo)

B: Apresentaram expressão indesejada em determinados tecidos - especialmente raiz

2) Tecidos neutros: expressão em frutos com mais de 20 DAP e pouco ou nenhuma expressão em tecidos vegetativos. Esta categoria permitiu testar combinações com a de tecidos requeridos com o intuito de avaliar o impacto da expressão em tecidos neutros de uma forma global.

Tabela 3. Categorização de tecidos de algodoeiro em que o padrão de expressão era desejado/indesejado no estudo de promotores tecido-específicos

Tecidos desejados	Tecidos indesejados	Tecidos neutros
Botão floral	Raiz lateral	Pólen
Racemo	Pelo radicular	Estame
Flor antes da antese	Raiz principal	Fruto maduro
Pétala		Fibra madura
Sépala		Semente
Carpelo		Caule
Flor em antese		Pecíolo
Óvulo		Folha
Fibra no início da maturação		Cotilédone
Fruto no início da maturação		Hipocótilo
Fruto na fase intermediária de maturação		Meristema apical
		Plântula

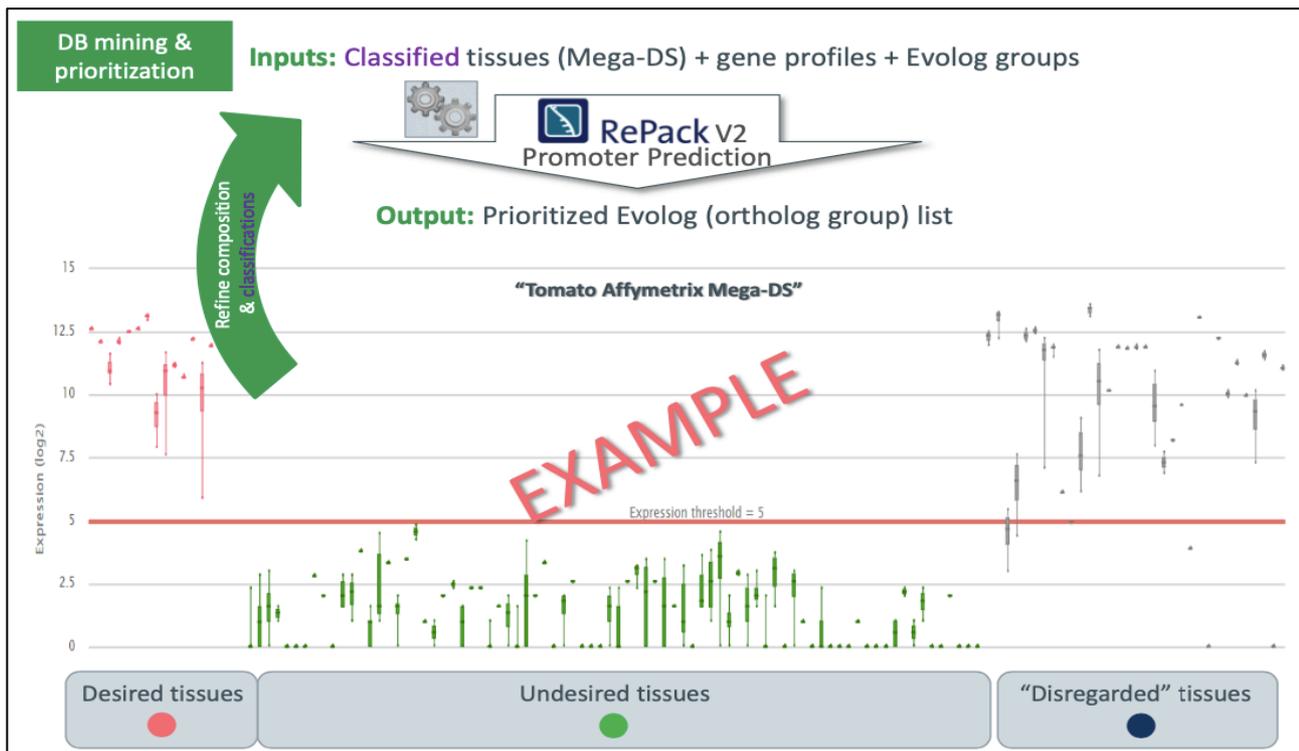


Figura 9. Representação gráfica da ordem de priorização de potenciais genes encontrados em tomate utilizando a plataforma de expressão gênica Affymetrix, baseado na prioridade de tecidos em que a expressão era desejada.

Além da classificação de potenciais promotores baseada na predição de em quais tecidos/órgãos a expressão seria observada e se esta expressão é desejada ou não, foram também traçados perfis de cada gene. A combinação destas duas informações possibilitou a geração de gráficos semelhantes ao da Figura 9 para cada espécie em cada plataforma utilizada. Foi estabelecido cinco como nível mínimo de expressão.

Em seguida, com todos estes dados, foi possível desenvolver uma lista com todos os promotores que apresentaram potencial de dirigir a expressão em tecidos reprodutivos e nas fases de desenvolvimento desejadas atendendo aos seis critérios estabelecidos pelos pesquisadores para a avaliação heurística. Foram selecionados dez promotores, resultado de consenso entre os pesquisadores (Tabela 3) e destes, nove promotores provenientes de algodão e um de *A. thaliana* (IMA 025). A razão para a escolha deste promotor deu-se pela sua avaliação positiva em todos os critérios, excetuando-se a expressão na maturação do pólen.

Tabela 4. Relação de promotores escolhidos para realização dos ensaios de expressão após a priorização heurística* com base em cinco critérios de avaliação

Promotor	Espécie	Tamanho do promotor	Confiabilidade da sequência	Expressão ao longo do desenvolvimento	Expressão na maturação do pólen	Expressão em raiz
IMA 001	Algodão	5	5	5	5	5
IMA 006	Algodão	5	5	5	3	5
IMA 010	Algodão	5	5	5	3	5
IMA 014	Algodão	4	5	5	5	5
IMA 017	Algodão	5	3	2	4	5
IMA 025	<i>Arabidopsis</i>	5	5	5	3	5
IMA 027	Algodão	5	5	5	5	5
IMA 029	Algodão	5	5	3	3	5
IMA 030	Algodão	5	5	5	5	5
IMA 036	Algodão	5	5	5	5	5

* Todos as notas foram baseadas em avaliação heurística e não representam nenhum tipo de valor absoluto

Desejável 5 4 3 2 1 Indesejável

Considerando os seis critérios estabelecidos (Tabela 3), os promotores IMA 001, IMA 027, IMA 030 e IMA 036 foram identificados como os de maior potencial tecido-específico por atender a todos os critérios com nota máxima (5). Por outro lado, de todos os promotores escolhidos, IMA 017 foi avaliado com as menores notas, especialmente nos quesitos de confiabilidade da sequência – o que significa que foram encontradas divergências entre os dados obtidos nas plataformas de expressão gênica e, expressão ao longo do desenvolvimento bem como expressão na maturação do pólen. A expressão ao longo do desenvolvimento foi definida como um dos critérios com o intuito de avaliar a atividade temporal-específica do promotor, ou seja, se ele é capaz de dirigir expressão apenas no momento do desenvolvimento reprodutivo ou se está ativo ao longo de todo o desenvolvimento da planta. IMA 017 foi escolhido, ainda que com estas limitações, por ser um promotor proveniente de algodão e pela não expressão em raiz, duas características altamente desejadas. De forma semelhante, IMA 029 teve notas baixas na expressão ao longo de desenvolvimento e expressão na maturação do pólen. Foi escolhido pelas mesmas razões que o promotor IMA 017.

Com relação ao tamanho total do promotor, apenas IMA 014 não obteve nota máxima, entretanto ao final todos os promotores foram sintetizados com o mesmo

tamanho (1000 pb). Considerou-se que 1000 pb a montante da região codificante conteriam os elementos regulatórios suficientes para a promoção da transcrição de forma eficiente. Estes elementos regulatórios foram preditos na análise realizada pela Evogene®.

Dentre todos os critérios avaliados, foi primordial que os promotores não dirigissem a expressão em raiz- todos os promotores tiveram nota máxima. Dos demais critérios, o que mais diferiu entre os promotores foi a expressão ao longo da maturação do pólen. A avaliação deste critério foi especialmente importante porque a expressão especificamente na fase reprodutiva foi a que norteou a escolha dos promotores. Contudo, a expressão na antera gera questões associadas à biossegurança devido ao risco de impacto sob a população de insetos polinizadores, especialmente abelhas. Neste sentido, os promotores IMA 001, IMA 010, IMA 027, IMA 030 e IMA 036 (todos provenientes de algodão) apresentaram maior especificidade temporal.

3.2 Ensaios histoquímicos de gus com A. thaliana

Um dos mais importantes critérios estabelecidos para a escolha dos promotores na avaliação *in silico* foi a ausência de expressão em raiz e, inicialmente todos os promotores escolhidos se encaixavam (Tabela 3). Entretanto, nos ensaios com *Arabidopsis* isto não foi observado (Tabela 5). Com exceção do IMA 017, IMA 030 e IMA 036, todos os promotores apresentaram expressão em raiz e folha em pelo menos um indivíduo. IMA 017, bem como o controle negativo pC3300, não apresentou atividade em nenhum outro tecido avaliado em nenhum dos indivíduos (Figura 10). IMA 017 foi também o promotor com a avaliação mais baixa na priorização heurística (Tabela 3), resultado que se confirmou nos testes com *Arabidopsis*. Da mesma forma, IMA 029 recebeu notas baixas em dois critérios e apresentou baixo desempenho nos ensaios histoquímicos: sete indivíduos não tiveram atividade em nenhum dos órgãos e, apenas um indivíduo apresentou atividade em todos os órgãos, entretanto em nível baixo. Outros dois tiveram expressões pontuais. IMA 036 seguiu o mesmo padrão com apenas um indivíduo que apresentou expressão com baixa intensidade em folha.

Os promotores IMA 010 (intensidade média), IMA 027 (intensidade baixa) e IMA 029 (intensidade baixa) apresentaram expressão em raiz em apenas um dos indivíduos. Especialmente na avaliação do promotor IMA 027, este resultado não corrobora com a avaliação *in silico* (Tabela 3 e Figura 11), tendo em vista que este era

um dos promotores mais promissores e de melhor avaliação em todos os critérios. IMA 001 também estava neste grupo de promotores com maior potencial de especificidade tecido-temporal. Nos ensaios histoquímicos com *Arabidopsis* observou-se que este promotor foi capaz de dirigir altos níveis de expressão em flor e sílica, como previsto. Entretanto, também apresentou atividade em tecidos vegetativos – folha em alta intensidade e raiz em baixa intensidade, na maior parte dos indivíduos avaliados. O seu desempenho pode ser comparado ao do controle positivo CaMV35S em intensidade e em perfil constitutivo.

Se for traçada uma comparação entre o promotor CaMV35S (Figura 12) e o promotor IMA 001 (Figura 13), observa-se que quatro indivíduos da progênie do CaMV35S apresentaram expressão em todos os tecidos avaliados, enquanto na progênie de IMA 001, foram seis indivíduos. Estes também apresentaram expressão em verticilos florais e sílica. Devido às dificuldades associadas ao tamanho da flor de *Arabidopsis*, não houve separação dos verticilos masculinos e femininos, portanto a avaliação foi feita de forma global. Em raiz, nas progênies de ambos os promotores, sete indivíduos apresentaram expressão - CaMV35S em alta intensidade e IMA 001 em baixa intensidade.

Outro promotor que apresentou forte expressão foi o IMA 006, que na avaliação *in silico* só recebeu nota abaixo de cinco em um critério – expressão na maturação do pólen. No ensaio com *Arabidopsis*, três indivíduos apresentaram alta expressão constitutiva em todos os tecidos assim como o controle CaMV35S e, diferente dos demais promotores, um dos indivíduos apresentou expressão somente em flor e sílica mostrando um padrão tecido-específico como era desejado. Outros cinco indivíduos não tiveram expressão em nenhum órgão e apenas um apresentou expressão baixa somente em folha.

IMA 010 e IMA 014 apresentaram apenas dois indivíduos com expressão na maioria ou em todos os órgãos. IMA 014 apresentou ainda outros dois indivíduos com expressão somente em folha e flor, o que foi observado também no IMA 030, apenas quatro indivíduos mostraram expressão e, em todos os casos, somente em folha e flor e em níveis baixos. IMA 030 também estava entre os promotores com maior potencial tecido-específico e com avaliação alta em todos os critérios *in silico*. IMA 025 (Figura 14) foi o único promotor proveniente de *Arabidopsis*. No ensaio histoquímico apenas dois indivíduos tiveram expressão constitutiva e comparável ao controle positivo CaMV35S.

Outros dois indivíduos apresentaram expressão mediana e destes, apenas um não apresentou expressão na raiz. Os demais indivíduos não tiveram expressão em nenhum dos órgãos avaliados.

Em uma análise dos promotores como um todo, não foi observado o mesmo padrão de expressão em flor e em sílica. No controle CaMV35S, a atividade do gene *gus* em sílica foi menor do que em flor nos quatro indivíduos que tiveram expressão. IMA 010 seguiu o mesmo perfil de redução da atividade do gene *gus* da flor para a sílica e no IMA 025 a atividade foi igual em ambos os órgãos. De uma maneira geral, a folha foi o órgão que teve o maior nível de expressão se comparado aos demais considerando a avaliação em todos os promotores. Não foi observada relação entre a previsão heurística dos promotores e os resultados do ensaio histoquímico com *Arabidopsis*. Sendo assim, nenhum dos promotores avaliados apresentou atividade tecido-específica.

Tabela 5. Intensidade da expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA em folha, flor, sílica e raiz de dez plantas de *A. thaliana* transformadas*

Vetores		Plantas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pC3300 (controle negativo)	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Flor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pC3301 (controle positivo)	Folha	0	4	0	4	0	4	1	0	4	0
	Flor	0	3	0	3	0	3	0	0	3	0
	Sílica	0	4	0	4	0	4	0	0	4	0
	Raiz	1	4	0	4	0	1	1	4	4	0
IMA 001	Folha	4	4	0	3	3	0	4	2	0	4
	Flor	2	2	0	2	3	0	2	1	0	4
	Sílica	3	2	0	3	3	0	2	0	0	4
	Raiz	2	1	0	1	1	0	1	0	1	1
IMA 006	Folha	0	0	3	4	0	1	0	0	4	0
	Flor	3	0	4	4	0	0	0	0	3	0
	Sílica	4	0	3	3	0	0	0	0	4	0

	Raiz	0	0	4	4	0	0	0	0	4	0
IMA 010	Folha	0	0	0	0	3	0	0	3	0	0
	Flor	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0
	Sílica	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
IMA 014	Folha	0	0	1	0	3	3	0	0	0	3
	Flor	0	0	1	0	3	3	0	0	0	3
	Sílica	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0
IMA 017	Folha	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Flor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMA 025	Folha	0	3	3	0	0	0	3	0	3	0
	Flor	0	3	3	0	0	0	2	0	3	0
	Sílica	0	3	3	0	0	0	2	0	3	0
	Raiz	0	1	3	0	0	0	0	0	3	0
IMA 027	Folha	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0
	Flor	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0
	Sílica	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
IMA 029	Folha	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0
	Flor	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	Sílica	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
IMA 030	Folha	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
	Flor	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
	Sílica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMA 036	Folha	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Flor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	Sílca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Raiz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* O vetor pC3300 (sem o gene *gus*) foi usado como controle negativo e o pC3301 como controle positivo (gene *gus* sob controle do promotor CAMV35S).

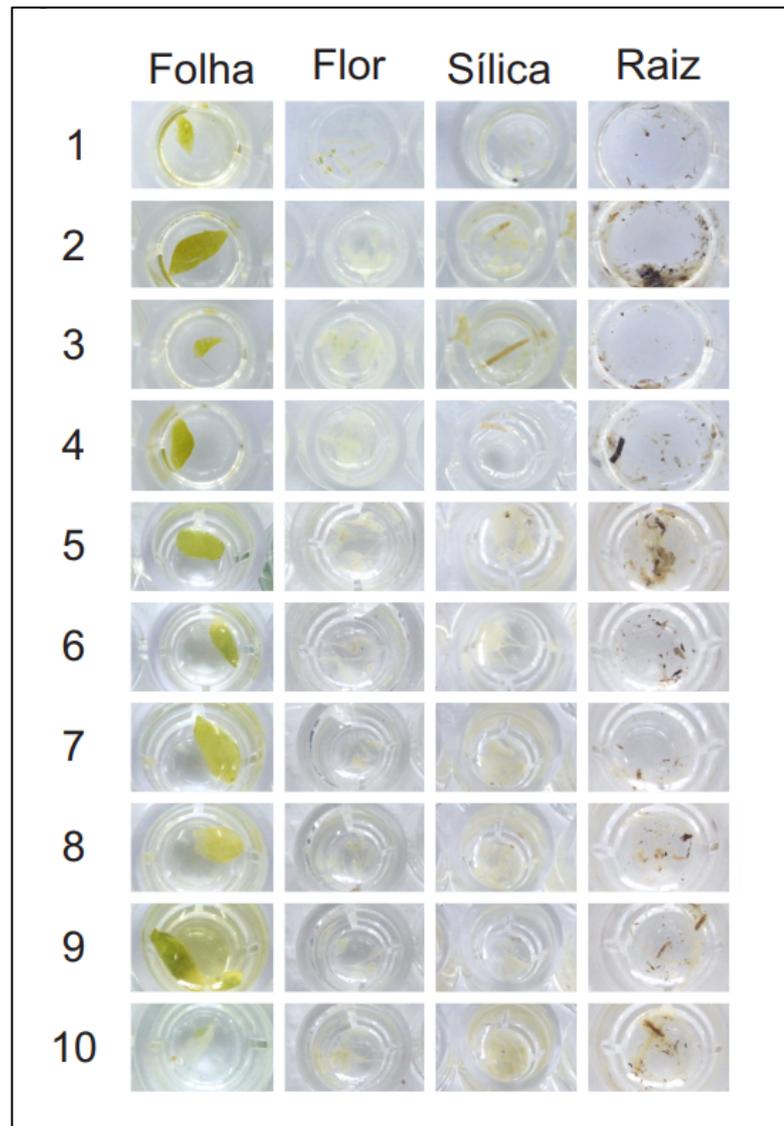


Figura 10. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 017 em folha, flor, sílica e raiz de *A. thaliana* transformada com o vetor pC3301IMA017pro.

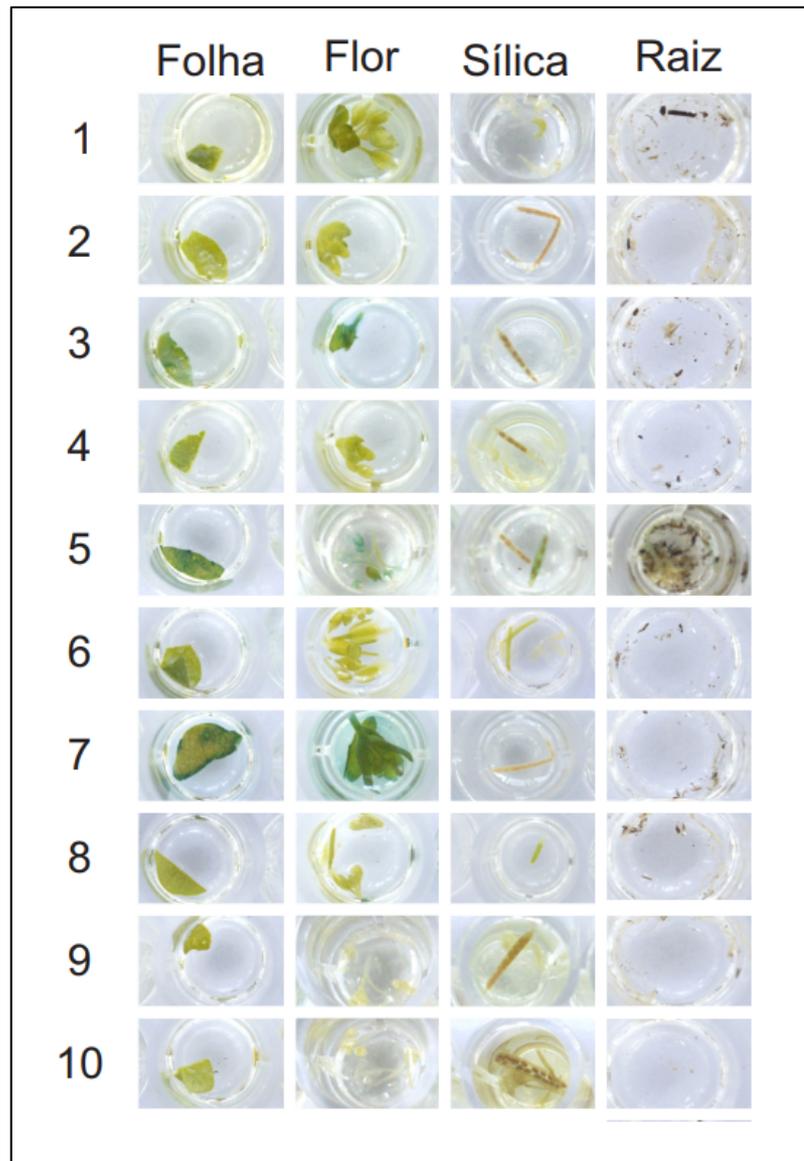


Figura 11. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 027 em folha, flor, sílica e raiz de *A. thaliana* transformada com o vetor pC3301IMA027pro.

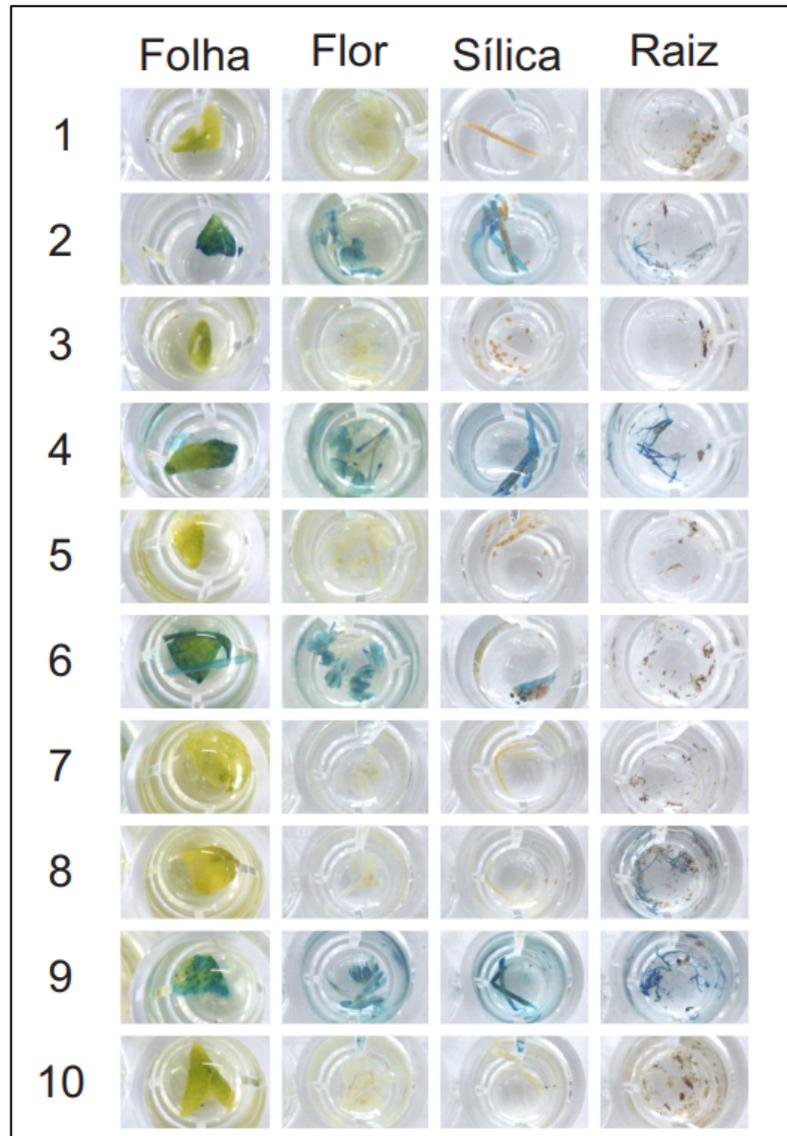


Figura 12. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S em folha, flor, sílica e raiz de *A. thaliana* transformada com o vetor pC3301.

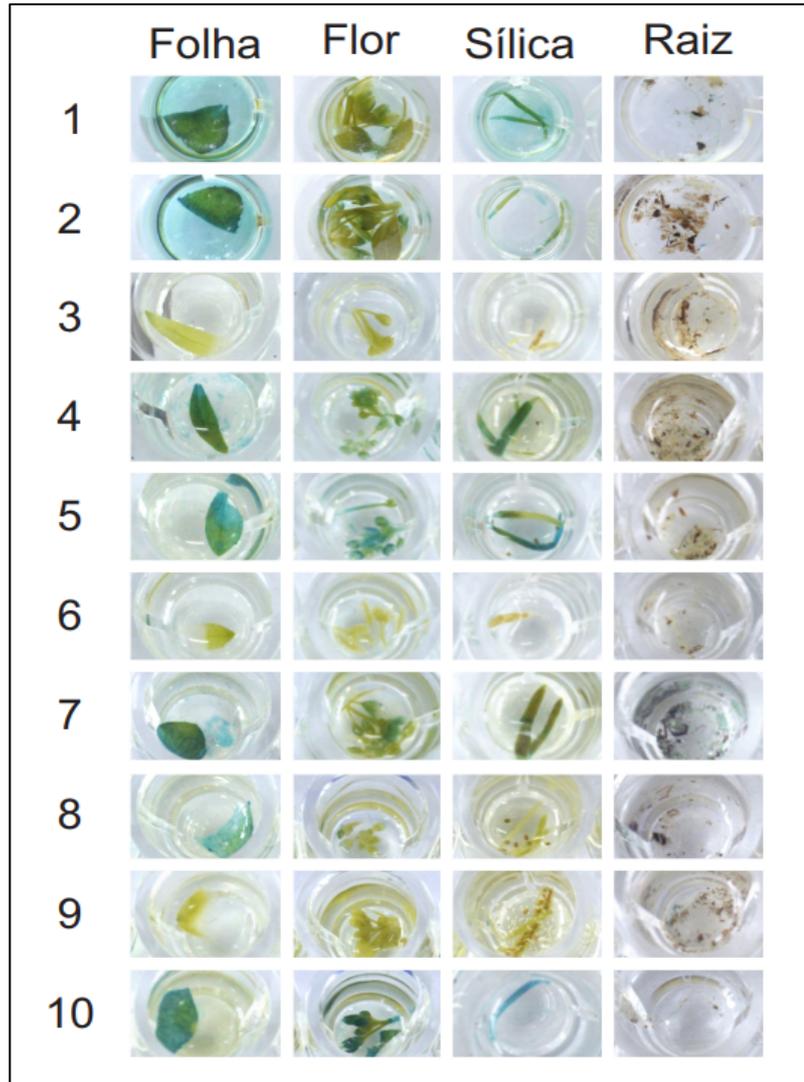


Figura 13. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 001 em folha, flor, sílica e raiz de *A. thaliana* transformada com o vetor pC3301IMA001pro.

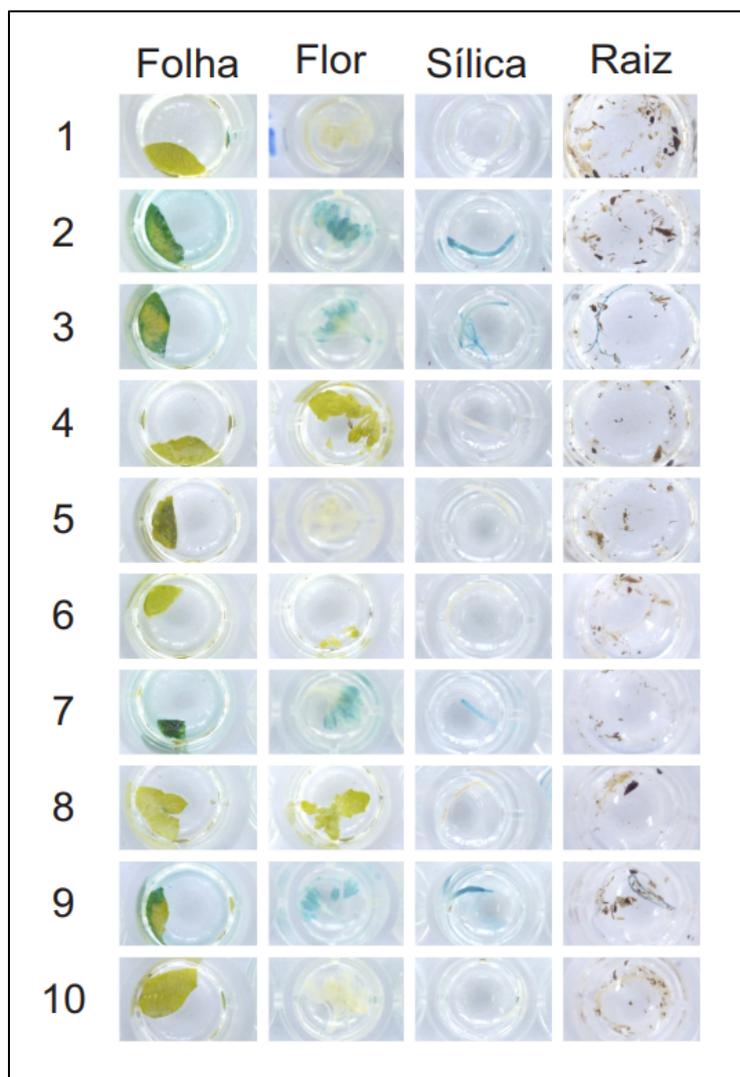


Figura 14. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 025 em folha, flor, sílica e raiz de *A. thaliana* transformada com o vetor pC3301IMA025pro.

3.3 Avaliação de resultados com ensaios histoquímicos com *G. hirsutum*

No intuito de avaliar a atividade do gene *gus* sob controle dos diferentes promotores na planta alvo comparar com os resultados tanto da análise *in silico* quanto dos ensaios realizados com *A. thaliana* como planta modelo, os testes em algodão foram realizados com cada tecido individualmente. Os resultados estão agrupados em tecidos vegetativos, verticilos florais, fruto e semente.

3.3.1 Tecidos vegetativos

A expressão do gene *gus* sob controle do CaMV35S, usado como controle positivo, foi alta em todos os tecidos vegetativos – folha, pecíolo e radícula (Tabela 6 e

Figura 15). Com expressão equivalente ao controle, IMA 001 foi o promotor IMA que apresentou o maior nível de expressão tanto em folha quanto pecíolo (Figura 16). Em radícula, a expressão foi mais baixa do que a do CaMV35S e equivalente à dos promotores IMA 014, IMA 027 e IMA 030. O menor nível de expressão foi observado nos promotores IMA 025 e IMA 036. Por outro lado, IMA 006, IMA 010, IMA 017 e IMA 029 não tiveram expressão, bem como o controle negativo.

Tabela 6. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em folha, pecíolo e radícula de *G. hirsutum* e expressos em escala de nota (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada)

Promotor	Folha	Pecíolo	Radícula
CaMV35S (controle positivo)	4	3	3
IMA 001	2	3	2
IMA 006	0	0	0
IMA 010	3	1	0
IMA 014	0	0	2
IMA 017	0	0	0
IMA 025	1	0	1
IMA 027	1	0	2
IMA 029	0	0	0
IMA 030	0	0	2
IMA 036	0	0	1
Controle negativo	0	0	0

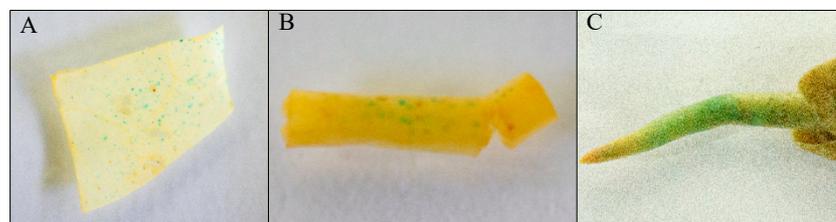


Figura 15. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S em A: folha, B: Pecíolo e C: radícula de *G. hirsutum* transformados com o vetor pUC35SGUS.

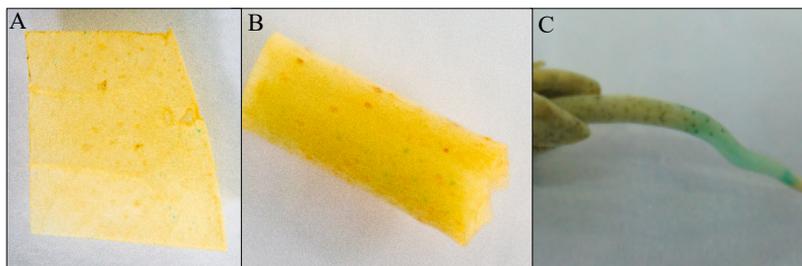


Figura 16. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 001 em A: folha, B: Pecíolo e C: radícula de *G. hirsutum* transformados com o vetor pIMA001proGUS.

Se for traçado um paralelo entre os ensaios de *Arabidopsis* com os de algodão, IMA 017 em tecidos vegetativos de ambas as espécies seguiu o mesmo padrão e não mostrou atividade. O promotor IMA 006 também não mostrou atividade em nenhum dos tecidos avaliados de algodão, resultado que difere dos ensaios de *Arabidopsis* em que este promotor dirigiu alto nível de expressão em folha e raiz.

Por outro lado, IMA 001 seguiu o mesmo perfil constitutivo em ambas as espécies, confirmando não ter nenhuma especificidade de tecido, diferente do previsto *in silico* (Tabela 3, Tabela 6 e Figura 16). Os promotores IMA 027, IMA 030 e IMA 036 também estavam entre os que tinham o maior potencial tecido e temporal-específico. Nos ensaios com algodão, IMA 027 teve resultados semelhantes aos de *Arabidopsis*, com expressão baixa tanto em folha quanto em raiz. Já as análises do gene *gus* dirigido pelos promotores IMA 030 e IMA 036 apresentaram resultado oposto ao do ensaio com *Arabidopsis*: IMA 030 e IMA 036 foi observado expressão somente em raiz de algodão (Figura 17), enquanto em *Arabidopsis* foi observada expressão somente em folha. Em nenhum dos três promotores houve expressão em pecíolo. Neste tecido, somente IMA 001 (nível alto) e IMA 010 (nível baixo) dirigiram expressão. Em *Arabidopsis*, IMA 010 teve ainda alta expressão em raiz, o que não foi observado em algodão. IMA 025, o único promotor proveniente de *Arabidopsis*, não foi capaz de dirigir expressão em alto nível nos tecidos vegetativos de algodão como foi observado em tecidos de *Arabidopsis* (Figura 18). Os resultados de IMA 006, IMA 010 e IMA 025 vão de encontro do que foi previsto *in silico*, tendo em vista que a avaliação dos três promotores nesta etapa foi promissora.

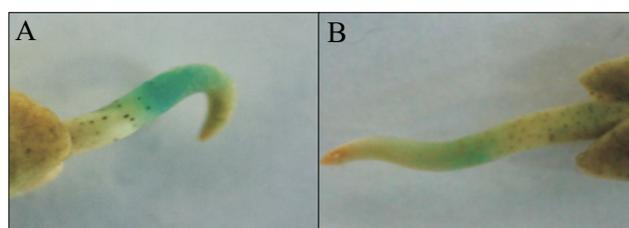


Figura 17. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor A: IMA 030 e B: IMA 036 em radículas de algodão.

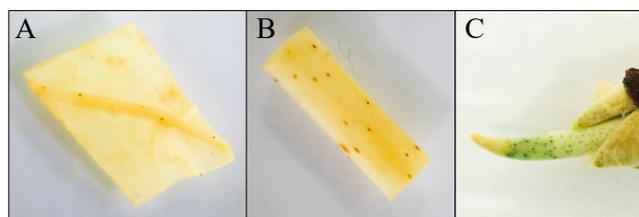


Figura 18. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 025 em tecidos vegetativos de algodoeiro (A: folha, B: pecíolo e C: radícula)

3.3.2 Verticilos florais

Os verticilos florais - estigma, antera, ovário e pétala, e também o botão floral, foram avaliados (Tabela 7). De todos os promotores IMA testados e do controle positivo, apenas IMA 001 e IMA 010 dirigiram a expressão do gene *gus* em todos os tecidos avaliados nesta categoria. Somente o controle negativo não teve atividade em nenhum dos tecidos. Os promotores IMA 014, IMA 027, IMA 029, IMA 030 e IMA 036 mostraram expressão pontual, apenas em um tecido e em nível baixo, excetuando IMA 036 que teve alta expressão no botão floral.

Em estigma, não foi observada expressão do gene *gus* sob o controle de nenhum dos promotores, ou seja, a estrutura exposta ao bombardeamento não apresentou nenhum sinal de expressão. Os pontos azuis observados referem-se aos grãos de pólen depositados sob a estrutura do estigma no momento da coleta – antese (flor branca) (Figura 19). Devido a este fato, a avaliação desta estrutura foi considerada inconclusiva.

Tabela 7. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em antera, ovário e radícula de *G. hirsutum* transformados e expressos em escala de nota (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).

Promotor	Antera	Ovário	Botão floral
CaMV35S (controle positivo)	4	0	4
IMA 001	2	2	4
IMA 006	0	0	4
IMA 010	1	4	4
IMA 014	0	0	2

IMA 017	0	1	1
IMA 025	2	0	3
IMA 027	0	0	2
IMA 029	0	0	0
IMA 030	0	2	0
IMA 036	0	0	3
Controle negativo	0	0	0



Figura 19. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA 010 e C: IMA 017 em secção do estigma da flor de algodoeiro coletada no estágio de antese.

Na antera, o maior nível de expressão observado foi no controle positivo CaMV35S (Figura 20) e, dentre os promotores IMA, nenhum apresentou atividade na mesma intensidade. O nível mais alto foi observado nos promotores IMA 001 e IMA 025 que, em testes com *Arabidopsis* (Tabela 5), também apresentaram atividade em flor. Na priorização heurística, a expressão na maturação do pólen (Tabela 3) era indesejada e foi o critério que teve maior divergência de nota entre os promotores selecionados. Nesta avaliação, IMA 001 estava entre os que dirigiram menor nível de expressão, assim como IMA 027, IMA 030 e IMA 036. Entretanto em testes com anteras de algodão (Tabela 7), somente IMA 001 apresentou atividade. IMA 025, recebeu nota três na avaliação *in silico* e apresentou atividade alta em anteras de algodão, confirmando o previsto (Figura 20). IMA 010 recebeu a mesma nota no critério expressão na maturação do pólen, mas apresentou atividade baixa em antera. Não foi observada expressão do gene *gus* no controle negativo. Os resultados dos promotores IMA apontam para uma divergência entre o resultado dos testes *in silico* e a validação na espécie-alvo. A avaliação comparativa da expressão do gene *gus* em flor de *Arabidopsis* e de algodão não pôde ser feita de forma detalhada, tendo em vista que a flor de *Arabidopsis* não foi seccionada.

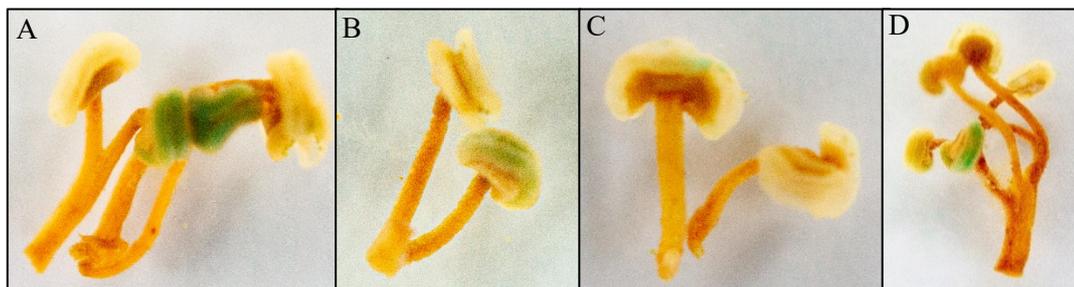


Figura 20. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA 001, C: IMA 010 e D: IMA 025 em anteras de flor de algodoeiro coletada no estágio de antese.

Em ovário (dados não apresentados em foto), a maioria dos promotores, bem como o controle negativo, não apresentou atividade. Diferente dos resultados de antera, IMA 010 foi o promotor com maior atividade, inclusive comparável ao CaMV35S, utilizado como controle positivo e que teve expressão pontual neste órgão. IMA 001 e IMA 030 apresentaram expressão em menor intensidade do que IMA 010 e, IMA 017 foi o promotor com o nível mais baixo. Em testes com *Arabidopsis*, este promotor não mostrou expressão em nenhum dos tecidos avaliados e, na avaliação *in silico*, foi o promotor com a avaliação mais baixa (Tabela 3). IMA 025, promotor proveniente de *Arabidopsis* e com atividade em antera, não mostrou expressão em ovário.

No botão floral, apenas IMA 029 e IMA 030 não tiveram atividade, bem como o controle negativo (Tabela 7). A expressão do gene *gus* sob controle do CaMV35S, foi alta. A atividade dos promotores IMA 001, IMA 006 e IMA 010 foi equivalente à do controle positivo (Figura 21). Os resultados do promotor IMA 010 em botão floral e em ovário foram semelhantes e confirmam a previsão de que a expressão seria mantida ao longo do desenvolvimento reprodutivo (Tabela 3). IMA 025 e IMA 036 tiveram expressão mais baixa e IMA 014 teve a menor atividade observada.

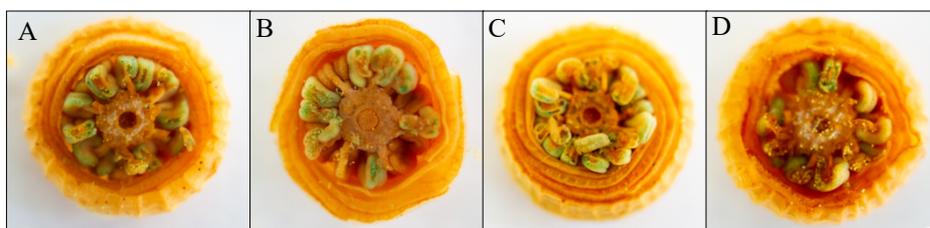


Figura 21. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores A: CaMV35S, B: IMA 001, C: IMA 006 e D: IMA 010 em secções de botão floral de algodoeiro.

3.3.3 Fruto

A avaliação do fruto foi realizada em dois estágios – inicial e final, observando nas secções, a coloração da fibra e a presença de pontos azuis em todas as partes expostas

ao bombardeamento - fibra, carpelo, semente e pericarpo. Foram também realizados testes individualizados com fibra e carpelo. Os resultados de fibra foram inconclusivos (dados não apresentados) e no carpelo, apenas o promotor CaMV35S, utilizado como controle positivo, apresentou expressão em nível baixo na parte interna (Figura 22).

Tabela 8. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em fibra, carpelo, semente e pericarpo de dois estágios de desenvolvimento do fruto de *G. hirsutum* e expressos em escala de nota (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada)

Promotor	Estágio inicial	Estágio final	Pericarpo
CaMV35S (controle positivo)	3	4	0
IMA 001	0	4	0
IMA 006	3	2	2
IMA 010	2	4	2
IMA 014	2	1	0
IMA 017	1	3	0
IMA 025	2	0	0
IMA 027	1	2	0
IMA 029	2	3	0
IMA 030	1	1	0
IMA 036	1	2	0
Controle negativo	0	0	0



Figura 22. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor CaMV35S no carpelo do fruto de algodoeiro transformado com o vetor pUC35SGUS

Em frutos no estágio inicial, o maior nível de expressão do gene *gus* foi sob o controle dos promotores CaMV35S predominantemente na fibra e IMA 006, na fibra e no carpelo, o que confirma os resultados de expressão do gene *gus* em sílica de *Arabidopsis* (Figura 23 e Tabela 4). O promotor IMA 010 apresentou pontos azuis na parte interna do carpelo, entretanto com menor atividade em fibra. Junto com ele, IMA 014, IMA 025 e IMA 029 também tiveram o mesmo nível de expressão somente na fibra, mas sem atividade em outras partes. Na semente, apenas IMA 025 apresentou pontos azuis (Figura 24). IMA 001 foi o único promotor que não apresentou coloração em nenhuma das partes analisadas, assim como o controle negativo. Excetuando IMA 006 e IMA 027, os demais promotores não mostraram relação entre a expressão em sílica de *Arabidopsis* e nos frutos de algodão. Não foi observada relação entre a expressão do gene *gus* no ovário (Tabela 7) e, no fruto em fase inicial de desenvolvimento (Tabela 8) como havia sido previsto, tendo em vista que um dos principais critérios para a escolha dos promotores foi o alto nível de expressão constitutiva em flor e frutos jovens.



Figura 23. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor A: CaMV35S, B: IMA 006 e C: IMA 010 em frutos de algodoeiro no estágio inicial de desenvolvimento.



Figura 24. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor IMA 025 observada na semente no fruto de algodoeiro em estágio inicial de desenvolvimento.

No estágio final de desenvolvimento, os promotores IMA 001 e IMA 010 tiveram expressão semelhante à do promotor CaMV35S em fibra e no pericarpo (Figura 25). IMA 017 e IMA 029 tiveram atividade inferior à do controle, entretanto o promotor IMA 017, além de ter expressão em fibra também apresentou atividade em pericarpo. A maioria dos promotores dirigiu maior expressão do gene *gus* no fruto no estágio final se comparado ao estágio inicial de desenvolvimento. O promotor IMA 027 mostrou aumento, entretanto em nível baixo, assim como IMA 036. Por outro lado, IMA 006 e IMA 014 tiveram redução do nível de expressão. IMA 030 teve manutenção da baixa atividade nos dois estágios e IMA 025 foi o único promotor que não dirigiu expressão, bem como o controle negativo.



Figura 25. Expressão do gene *gus* sob controle do promotor A: CaMV35S, B: IMA 006 e C: IMA 010 em frutos de algodoeiro no estágio final de desenvolvimento

Em uma comparação da expressão do botão floral ao fruto em estágio final (Tabela 7 e Tabela 8), ainda que com redução no estágio inicial de desenvolvimento, os promotores CaMV35S, IMA 010, IMA 017, IMA 027 e IMA 036 se encaixam em um padrão desejável, tendo em vista que o foco deste estudo é o controle do bicudo do algodoeiro. Se este resultado for comparado com os resultados da etapa de ensaios *in*

silico, são observadas controvérsias. O promotor IMA 017 recebeu a nota mais baixa (dois) no critério expressão ao longo do desenvolvimento contudo mostrou manutenção da expressão, mesmo em nível baixo. Já os promotores IMA 001, IMA 006, IMA 014, IMA 025, IMA 029 e IMA 030 em que a manutenção da expressão era esperada, não foi observada (Tabela 3).

3.3.4 Semente

Os ensaios foram realizados inicialmente com semente madura e três tecidos foram testados: endosperma, cotilédone e embrião. Dentre os promotores que tiveram expressão, não foi observado o mesmo padrão nos três tecidos (Tabela 9). Com exceção de IMA 014 e IMA 017, os demais promotores apresentaram atividade em embrião, sendo que em 50% deles, a atividade foi equivalente à do controle CaMV35S.

Tabela 9. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em endosperma, cotilédone e embrião de sementes maduras de *G. hirsutum* e expressos em escala de nota (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).

Promotor	Endosperma	Cotilédone	Embrião
CaMV35S (controle positivo)	4	4	4
IMA 001	0	1	1
IMA 006	1	4	4
IMA 010	4	2	4
IMA 014	0	0	0
IMA 017	0	0	0
IMA 025	0	0	4
IMA 027	0	0	4
IMA 029	1	0	2
IMA 030	3	1	1
IMA 036	3	3	4
Controle negativo	0	0	0

Dentre os promotores IMA, a expressão mais alta foi do gene *gus* sob o controle do promotor IMA 036 (Figura 26B). No endosperma e no cotilédone, a atividade foi mais

baixa que a do controle positivo CaMV35S (Figura 26A) e no embrião foi equivalente. Os promotores IMA 006 e IMA 010 (Figura 26C e D) também apresentaram alta expressão no embrião, comparável com IMA 036. Em ambos os promotores houve atividade também no endosperma e no cotilédone em nível mais baixo. IMA 030 apresentou níveis mais baixos de expressão, sendo o mais alto observado no endosperma.

Por outro lado, IMA 001 teve atividade baixa em cotilédone e embrião e, IMA 029, teve atividade baixa em endosperma e embrião. IMA 025 (Figura 27) e IMA 027 tiveram alta expressão no embrião, contudo em endosperma e cotilédone não foi observada nenhuma atividade. IMA 014 e IMA 017, bem como o controle negativo não dirigiram expressão em nenhuma das partes da semente.

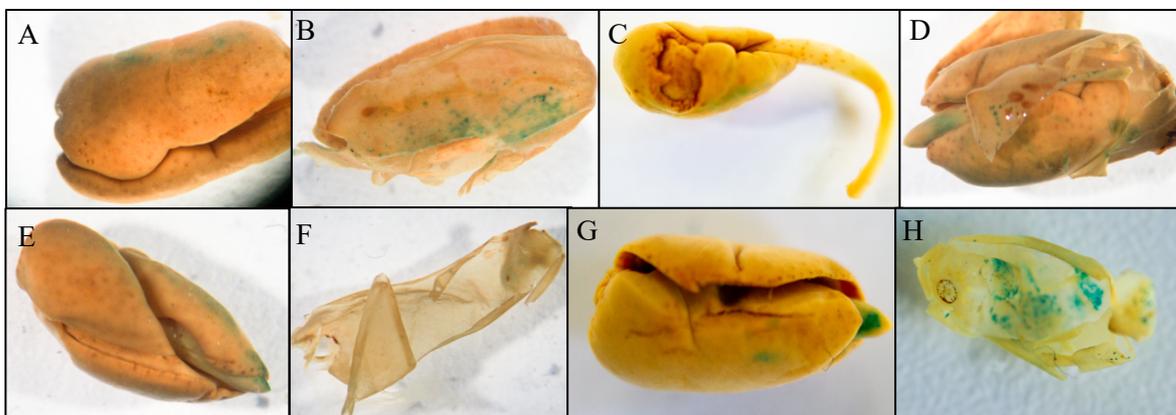


Figura 26. Expressão do gene gus sob controle do promotor A e B: CaMV35S, C e D: IMA 036, E e F: IMA 006 e G e H: IMA 010 no cotilédone, embrião e endosperma de sementes maduras de algodoeiro.



Figura 27. Expressão do gene gus sob controle do promotor IMA 025 no A: embrião, B: cotilédone e C: endosperma de sementes maduras de algodoeiro.

Após a realização dos testes com semente madura, fruto e verticilos florais, os resultados foram analisados e os promotores IMA 006, IMA 010, IMA 027, IMA 030 e IMA 036 escolhidos para a realização dos testes com quatro estágios de desenvolvimento da semente imatura (Tabela 10 e Figura 28). Todos os promotores escolhidos tiveram

atividade baixa ou nula em tecidos vegetativos e na antera. Com exceção de IMA 030 apresentaram também atividade em botão floral e na semente, principalmente no embrião.

Nenhum dos promotores apresentou expressão em todos os estágios. No controle positivo CaMV35S a expressão foi aumentando com o desenvolvimento da semente, com exceção do quarto estágio que não teve expressão. Dos promotores IMA, o que apresentou expressão ao longo do desenvolvimento foi IMA 010, com maior taxa de expressão no estágio 2, em que foi observada atividade no embrião e no cotilédone. Assim como no ensaio com semente madura (Tabela 9), a maior taxa foi em embrião. IMA 006, IMA 027 e IMA 030 dirigiram a expressão somente na última fase de desenvolvimento, com predominância no embrião e em nível baixo. IMA 036 teve expressão nos últimos dois estágios de desenvolvimento e em nível baixo.

Tabela 10. Expressão do gene *gus* sob controle dos promotores IMA, controle positivo e negativo em sementes imaturas de *G. hirsutum* coletadas de frutos de quatro estágios de desenvolvimento (15 mm, 20 mm, 25 mm e 30 mm de diâmetro) e expressos em escala de nota (0 - ausência total de área azul até 4 - maior área azul observada).

Promotor	Estágio 1 (15 mm)	Estágio 2 (20 mm)	Estágio 3 (25 mm)	Estágio 4 (30 mm)
CaMV35S (controle positivo)	1	2	4	0
IMA 006	0	0	0	2
IMA 010	0	3	1	1
IMA 027	0	0	0	1
IMA 030	0	0	0	2
IMA 036	0	0	2	1
Controle negativo	0	0	0	0

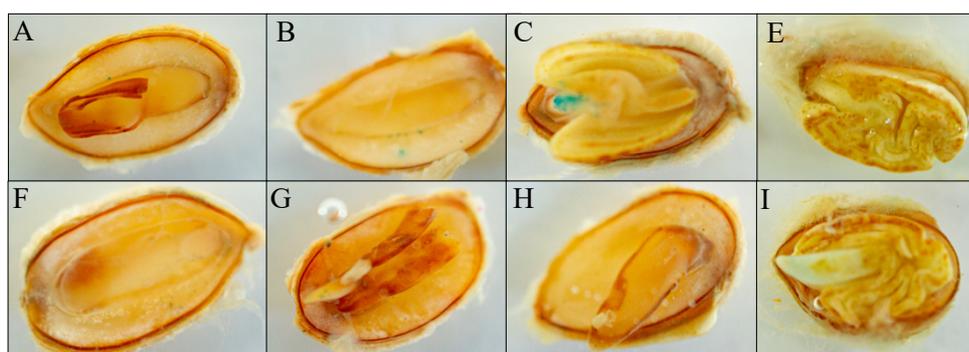


Figura 28. Expressão do gene *gus* sob o controle dos promotores A – E: CaMV35S e F-I: IMA 010 em quatro fases de desenvolvimento da semente imatura de algodoeiro.

4 DISCUSSÃO

A busca por novos promotores tem sido intensificada, levando em consideração a avaliação de um amplo espectro de alternativas de atividades e padrões temporais de expressão, as quais podem aumentar significativamente o sucesso da aplicação da tecnologia do DNA recombinante na geração de plantas GM, resultando na melhor combinação entre a frequência de transformação e na obtenção do fenótipo pretendido (Beringer et al., 2017). Além disso, em cassetes de expressão múltipla a utilização de diferentes promotores é considerada uma boa estratégia no sentido de evitar o silenciamento gênico causado pela homologia de sequência, que ocorre quando o mesmo promotor é usado no controle da expressão de vários transgenes (Potenza et al., 2004). Portanto, existe uma grande relevância no estudo de isolamento e caracterização de novos promotores. Atualmente, várias fontes têm sido desenvolvidas, mas somente uma pequena parcela é efetiva e amplamente utilizada.

No intuito de encontrar novos promotores, provenientes de planta e com perfil tecido-específico, foram selecionados para este estudo dez genes com expressão preferencial em verticilos florais e frutos de algodão. Os promotores IMA 001, IMA 006, IMA 010, IMA 014, IMA 017, IMA 029, IMA 030 e IMA 036 foram isolados de genes de algodão e, IMA 025, de *Arabidopsis*. Todos foram testados quanto à capacidade de dirigir expressão do gene *gus* em tecidos de *Arabidopsis* e avaliados em algodão, espécie-alvo. Segundo Hou et al. (2016), usar o padrão de expressão para determinar se os promotores são tecido-específicos ou induzíveis tem considerável importância na prática, tendo em vista que a restrição da expressão genética a determinadas condições e/ou tecidos eliminaria a sobrecarga desnecessária no metabolismo da planta como um todo.

No que diz respeito às características dos promotores selecionados para este estudo, todos têm o mesmo tamanho (1 kb). São preferidos promotores de 0,5 a 2 kb *upstream* ao sítio de iniciação da transcrição, ou seja, as menores sequências que tenham alta atividade transcricional e resultem no perfil transgênico desejado são de extrema relevância para o desenvolvimento de vetores compactos de transformação de plantas. Sabe-se ainda que o tamanho é diretamente associado à atividade do promotor, bem como a presença ou ausência de elementos regulatórios *in cis* neste fragmento determinam sua performance. Determinar o menor tamanho do promotor tem impacto positivo na

otimização da construção promotor-gene (Pandiarajan e Grover, 2018; Basso et al. 2020; Corte et al., 2020; Alok et al., 2020).

Dentre os critérios *in silico* utilizados para escolha dos promotores incluímos a expressão na raiz e expressão ao longo da maturação do pólen, que foram utilizados para descartar promotores que dirigiam a expressão nestes órgãos. Isto porque, faz-se necessário mensurar os potenciais impactos de cultivos GM em organismos não-alvo e garantir a segurança alimentar (Li et al., 2013). Neste sentido, de acordo com as análises *in silico*, nenhum dos promotores escolhidos dirigia a expressão em raiz, o que foi confirmado nos ensaios de *Arabidopsis* apenas nos testes com os promotores IMA 017, IMA 030 e IMA 036 e, nos testes de validação em algodão com os promotores IMA 001, IMA 014, IMA 025, IMA 027, IMA 030 e IMA 036. Mandal et al. (2020) advertem também sobre a necessidade de se avaliar o impacto da expressão do transgene no solo e na microbiota associada. Contudo, não há relatos de impacto negativo de cultivos GM sobre a biota do solo (Mátthe e Antofie, 2020).

Dentre todas as características, a expressão na maturação de pólen foi a que teve a maior divergência entre os promotores na avaliação heurística. Em anteras de algodoeiro, promotores inicialmente considerados potenciais como IMA 001 tiveram alta atividade e, promotores com notas mais baixas como IMA 010 mostraram menor intensidade. A avaliação da expressão de um determinado gene nos grãos de pólen é essencial devido à possibilidade de ocorrência de efeitos não-alvo em insetos polinizadores, em especial abelhas produtoras de mel, e inimigos naturais que são essenciais para manter a estabilidade nos agrossistemas (Ricroch et al., 2018; Souza et al., 2019).

A expressão ao longo do desenvolvimento também foi avaliada, tendo em vista que a regulação da expressão do transgene no tecido e durante a fase de desenvolvimento em que ocorre o ataque de uma determinada praga é requerida para minimizar os efeitos indesejados na fisiologia da planta como um todo (Dubey et al., 2018). A maioria dos promotores escolhidos, com exceção de IMA 017 e IMA 029, apresentavam grande potencial tecido e temporal-específico nos testes *in silico*, entretanto os resultados de ensaios histoquímicos com *Arabidopsis* foram divergentes.

O promotor IMA 001, que estava entre os que receberam a melhor avaliação na priorização heurística, apresentou em *Arabidopsis* alto nível de expressão em flor e sílica

como previsto, entretanto, a atividade também foi alta em folha e baixa em raiz. Em comparação com o controle positivo CaMV35S, nos ensaios com *Arabidopsis*, IMA 001 apresentou mais indivíduos da mesma progênie com expressão em todos os tecidos, o que define seu padrão constitutivo. Resultado semelhante foi encontrado por Bao et al. (2015) em testes com o promotor *GhEF1A1.7* isolado de algodão e com potencial tecido-específico inicialmente, mas quando testado em tabaco mostrou-se constitutivo.

A despeito do perfil constitutivo, IMA 001 é um promotor potencial por ter sido isolado de planta e ter características desejadas de baixa atividade na raiz e na antera - perfil confirmado em testes com algodoeiro. A sua utilização em cassetes de expressão tende a causar menos efeitos indesejados e anomalias no fenótipo, características observadas com o uso do promotor CaMV35S proveniente de vírus - há relatos na literatura de efeito de silenciamento pós-transcricional, redução da habilidade da célula de reconhecer sequências como estranhas e inativá-las, além da redução na aceitação do produto pelo público consumidor (Jiang et al., 2018). Em milho, há também relatos de aumento da frequência de transformação com a utilização de promotores de planta quando comparados a construções em que foram utilizados promotores provenientes de vírus (Beringer et al., 2017).

Especificamente em algodão transformado com construções que continham o promotor CaMV35S, foram observados fenótipos anormais com maçãs menores do que o observado em plantas silvestres. Foi demonstrado também que a expressão dirigida pelo CaMV35S é observada na maioria das células e tecidos, contudo os níveis de expressão são influenciados pela fisiologia do algodão durante o desenvolvimento e por fatores ambientais (Wang et al., 2016).

Na comparação entre a avaliação *in silico* como um todo e os testes histoquímicos com *Arabidopsis*, vários resultados vão de encontro ao previsto, revelando que nenhum dos promotores apresentou atividade tecido-específica esperada. Em progênies de promotores como IMA 010, IMA 017, IMA 027, IMA 029, IMA 036 e também IMA 025 (proveniente de *Arabidopsis*), a maioria ou nenhum dos indivíduos mostrou expressão. Em uma avaliação global, considerando todos os órgãos avaliados, a folha foi o que teve maior nível de expressão. A observação *in vitro* constitui um importante passo na verificação da funcionalidade dos novos promotores identificados, no sentido de confirmar o que foi previsto *in silico*. As divergências observadas podem

ser devido às diferenças na rede regulatória que permite a identificação dos genes envolvidos e a validação, que provê evidências de relevância funcional (Haque et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade tecido-específica dos promotores isolados de tecidos florais e frutos jovens no intuito de utilizá-los em construções que visam a resistência ao bicudo-do-algodoeiro. Nas últimas décadas, vários grupos de pesquisa têm tentado, por meio da inserção de genes endógenos, produzir algodão resistente aos mais diversos insetos-praga. Carriere et al. (2015) mostraram que a piramidação de dois ou mais entomotoxinas Cry tendo como alvo o mesmo inseto é uma estratégia potencial. Chakrabarty et al. (2020) observaram atividade inseticida de proteínas Vip de bactérias entomopatogênicas em espécies do gênero *Gossypium*. Apesar dos esforços, ainda não há uma estratégia eficaz no controle do bicudo-do-algodoeiro.

Os promotores selecionados para este estudo, foram avaliados em diferentes tecidos de algodão, espécie-alvo, com o objetivo de prover uma resposta direta sobre a fase de desenvolvimento e localização da expressão do gene *gus* dirigido por cada um dos promotores. Na maior parte dos testes em diferentes tecidos, os resultados apontaram diferenças entre a expressão em *Arabidopsis* e algodão. Há relatos semelhantes na literatura com outras espécies: o promotor *MdANSI* apresentou alto nível de atividade em órgãos reprodutivos em maçã e baixo em tabaco, o que segundo os autores, pode ser devido às diferenças no tipo de desenvolvimento do fruto das duas espécies. O promotor do gene *LePDS* de tomate teve alta atividade em tomate e baixa em tabaco nos órgãos em que não foram encontrados cromoplastos (Kim et al., 2006; Corona et al., 1996). Espécies não relacionadas podem não ter todos os fatores de transcrição que se ligam aos elementos regulatórios do promotor e que são necessários para modular os níveis de transcrição (Corte et al., 2020).

Ao longo do desenvolvimento do fruto de algodoeiro, a expressão do gene *gus* variou – nos promotores IMA 006, IMA 014 e IMA 025 houve redução da atividade e nos demais, incluindo o controle CaMV35S, houve manutenção ou aumento expressivo do estágio inicial (20 DAP) e o estágio final (42 DAP). Entre ovário e fruto em estágio inicial também houve variação na expressão, o que sugere que a atividade é regulada pelo estágio de desenvolvimento, entretanto nem todos os promotores foram capazes de dirigir a expressão no momento em que era esperado – o objetivo deste estudo foi caracterizar

promotores capazes de dirigir a expressão em verticilos florais femininos e frutos no estágio inicial. Esta é a fase considerada de transição do crescimento das células da parede secundária para o início da desidratação e maturação do fruto e também preferencial para o ataque do bicudo do algodoeiro (Ritchie et al., 2004).

Esta variação no desenvolvimento já foi observada em genes sob controle de outros promotores. Yakoob et al. (2020) relataram aumento gradual do padrão de expressão do gene *CpEXPA1* sob controle do promotor tecido-específico GhSCFP na fase de 1 DPA a 18 DPA do desenvolvimento de fruto do algodoeiro. Essa manutenção da expressão ao longo do desenvolvimento é considerada relevante. Alguns estudos mostram que o promotor desempenha um papel importante no declínio da expressão, como é o caso do gene *Cry1Ac* sob o controle do CaMV35S que é atribuída à metilação do promotor (Siddiqui et al, 2019). Para a maioria das variedades comercializadas de algodão *Bt*, um alto nível da toxina é expresso no início da fase de desenvolvimento, mas decai significativamente com a idade da planta (Wang et al., 2016).

De todos os promotores avaliados e considerando testes em *Arabidopsis* e a avaliação em tecidos de algodão, os promotores IMA 006 e IMA 010 mostraram-se fortes e com alto potencial. Estes promotores apresentaram baixa (IMA 010) ou nenhuma (IMA 006) expressão em tecidos vegetativos, ausência de atividade em raiz e alta expressão em verticilos florais femininos, especialmente no botão floral – comparável com a do controle positivo CaMV35S. Em nenhum dos promotores foi observada alta atividade em antera. E, no fruto, foi observada expressão em todos os tecidos avaliados nas duas fases de desenvolvimento. IMA 006 destacou-se por, também, apresentar maior nível de expressão na fase inicial, como era desejado.

Na semente imatura, IMA 010 teve expressão nos últimos três estágios e IMA 006 somente no último estágio, entretanto na semente madura ambos apresentaram atividade em todos os tecidos. Promotores que tenham atividade na semente podem desempenhar um papel positivo não só no controle do bicudo, mas também da lagarta rosada do algodão (*Pectinophora gossypiella*), que se alimenta de flores e sementes (Siddiqui et al., 2019).

Estes resultados mostram que os promotores IMA 006 e IMA 010 têm perfil de expressão tecido-específico – foram capazes de dirigir altos níveis de expressão em tecidos preferenciais e baixo ou nenhuma expressão nos tecidos não-alvo. Entretanto,

quando se compara a atividade do gene *gus* sob controle do promotor *act2* (capítulo 1) e a dos promotores IMA, nenhum foi comparável em intensidade e nem tampouco em duração. Observa-se que o promotor *act2* manteve alta atividade em todos os tecidos e fases da flor, incluindo pétala, sépala e tricomas (Figuras 4 e 5 – Cap 1) e do fruto de algodoeiro. Neste sentido, o promotor *act2* é mais adequado para dirigir altos níveis de expressão de genes de resistência ao bicudo-do-algodoeiro.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Para a obtenção de plantas resistentes ao bicudo-do-algodoeiro é fundamental a utilização de promotores que dirijam o maior nível de expressão possível nos tecidos alvo da praga com o menor risco de sobrecarga na fisiologia da planta como um todo.

Este estudo caracterizou a expressão do gene *gus* dirigido por dez promotores com atividade potencial tecido-específica em *Arabidopsis* com avaliação em algodoeiro. Não foi observada relação do perfil de expressão em tecidos de *Arabidopsis* com a expressão em tecidos de algodoeiro.

O promotor IMA 001 apresentou perfil constitutivo em algodoeiro, com atividade semelhante ou superior ao controle positivo CaMV35S. Isto o torna em uma alternativa potencial de promotor de origem vegetal para manipulação genética com menor risco de obtenção de plantas com fenótipos diferentes dos desejados.

Os promotores IMA 006 e IMA 010 tiveram a maior atividade nos verticilos florais e mantiveram ao longo do desenvolvimento até a maturação do fruto. Ao mesmo tempo em que mostraram baixa ou nenhuma atividade em tecidos vegetativos e de raiz. Isto os torna adequados para o uso em construções genéticas que visem melhoramento da qualidade de aspectos relacionados à flor e ao fruto e aumento de produtividade.

De todas as alternativas avaliadas, o promotor do gene *act2* foi o que dirigiu o maior nível de expressão em tecidos-alvo do bicudo-do-algodoeiro.

Para validar a atividade dos promotores IMA será necessária a transformação de embriões e avaliação da expressão estável da progênie, de forma a assegurar que a característica desejada será expressa adequadamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alok A, Kaur J, Tiwari S. Functional characterization of wheat myo-inositol oxygenase promoter under different abiotic stress conditions in *A. thaliana*. *Biotechnology Letters* (2020).
- Anees M, Shad SA. Insect Pests of Cotton and Their Management. In: Ahmad S, Hasanuzzaman M (eds). *Cotton Production and Uses*. Springer (2020) 177-212.
- Aragão FJL, Vianna GR, Carvalheira SBRC, Rech EL. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Science* (2005) 168: 1227-1233.
- Bao S, Guo-qing S, Zhi-gang M, Rui Z, San-dui G. A novel constitutive promoter and its downstream 5' UTR derived from cotton (*Gossypium* spp.) drive high-level gene expression in stem and leaf tissues. *Journal of Integrative Agriculture* (2015) 3119: 1-11.
- Barros MAL, Da Silva CRC, De Lima LM, Farias FJC, Ramos GA, Dos Santos RC. A review on evolution of cotton in Brazil: GM, white, and colored cultivars. *Journal of Natural Fibers* (2020) 1-13.
- Basso MF, Lourenço-Tessutti I, Busanello C, Pinto CEM, Freitas EO, Ribeiro TP, Engler JA, Oliveira AC, Morgante CV, Ferreira MA, Grossi-de-Sá MF. Insights obtained using different modules of the cotton *uceA 1.7* promoter. *Planta* (2020) 251-256.
- Beringer J, Chen W, Garton R, Sardesai N, Wang P, Zhou N, Gupta M, Wu H. Comparison of the impact of viral and plant-derived promoters regulating selectable marker gene on maize transformation and transgene expression. *Plant Cell Reports* (2017) 36: 519-528.
- Carriere Y, Crickmore N, Tabashnik BE. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology* (2015) 33: 161-168.
- Chakrabarty S, Jin M, Wu C, Chakraborty P, Xiao Y. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. *Pest Management Science* (2020) 76: 1612-1617.

- Chen PY, Wang CK, Soong SC, To KY. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding* (2003) 11: 287-293.
- Corona V, Aracri B, Kosturkova G, Bartley GE, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik PA, Giuliano G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *The Plant Journal* (1996) 9:505–512.
- Corte LED, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA, Grosser JW, Dutt M. Functional characterization of full-length and 5' deletion fragments of *Citrus sinensis*-derived constitutive promoters in *Nicotiana benthamiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* (2020) 56: 280-289.
- Dubey NK, Mishra DK, Idris A, Nigam D, Singh PK, Sawant SV. Whitefly and aphid inducible promoters of *A. thaliana* L. *Journal of Genetics* (2018) 97: 109-119.
- Haque S, Ahmad JS, Clark NM, Williams CM, Sozzani R. Computational prediction of gene regulatory networks in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* (2019) 47: 96-105.
- Hou J, Jiang P, Qi S, Zhang K, He Q, Xu C, Ding Z, Zhang K, Li K. Isolation and functional validation of salinity and osmotic stress inducible promoter from the maize type-II H⁺-pyrophosphatase gene by deletion analysis in transgenic tobacco plants. *Plos One* (2016) 11:1-23.
- Jiang P, Zhang K, Ding Z, He Q, Li W, Zhu S, Cheng W, Zhang K, Li K. Characterization of a strong and constitutive promoter from the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene *AtSCPL30* as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnology* (2018) 18: 1-13.
- Kim SH, Lee JR, Kim SR. Characterization of an apple anthocyanidin synthase gene in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Biology* (2006) 49:326–330.
- Khan MA, Wahid A, Ahmad M, Tahir MT, Ahmed M, Ahmad S, Hasanuzzaman M. World Cotton Production and Consumption: An Overview. In: Ahmad S, Hasanuzzaman M. (eds) *Cotton Production and Uses*. Springer (2020) 1-7.

Li Y. Gene deleter: a new tool to address gene flow and food safety concerns over transgenic crop plants. *Frontiers in Biology* (2013) 7:565-576.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2020. Acessado em 6 de julho de 2020. http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.

Masood, A, Iqbal N, Mubeen H. A short review of promoters of cotton fibre genes: strength and tissue specificity. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences* (2020) 63: 127-131.

Mathe E e Antolie MM. Why is genetic modification of interest or why can it be useful? In: Andersen V (ed). *Genetically Modified and Irradiated Food*. Elsevier (2020): 3-25.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (1962) 15: 473–497.

Norrande J, Kempe T, Messing J. Construction of Improved M13 Vectors Using Oligodeoxynucleotide-Directed Mutagenesis. *Gene* (1983) 26:101-106.

Pandiarajan R e Grover A. In vivo promoter engineering in plants: Are we ready? *Plant Science* (2018) 277: 132-138.

Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* (2004) 40: 1-22.

Ritchie, GL, Bednarz CW, Jost PH, Brown SM. Cotton Growth and Development. Bulletin 1252. Cooperative Extension Service and the University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, Athens, GA, USA (2004) 12-13.

Ricroch A, Akkoyunlu S, Martin-Laffon J, Kuntz M. Chapter Five - Assessing the Environmental Safety of Transgenic Plants: Honey Bees as a Case Study. Kuntz M (ed) *Advances in Botanical Research*. Academic Press (2018) 86: 111-167.

Siddiqui HA, Asif M, Asad S, Naqvi RZ, Ajaz S, Umer N, Anjum N, Rauf I, Sarwar M, Arshad M, Amin I, Saeed M, Mukhtar Z, Bashir A, Mansoor S. Development and evaluation of double gene transgenic cotton lines expressing Cry toxins for protection against chewing insect pests. *Scientific Reports* (2019) 9: 11774.

Souza CSF, Marucci RC, Chaves DR, Mendes SM. Effects of Genetically Modified Plants with Bt Toxins on Natural Enemies. In: Souza B., Vázquez L., Marucci R. (eds) *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems*. Springer (2019) 489-496.

Yaqoob A, Shahid AA, Salisu IB, Shakoor S, Usmaan M, Shad M, Rao AQ. Comparative analysis of constitutive and fiber-specific promoters under the expression pattern of expansin gene in transgenic cotton. *Plos One* (2020) 15:1-13.

Zhang H, Hou J, Jiang P, Qi S, Xu C, He Q, Ding Z, Wang Z, Zhang K, Li K. Identification of a 467 bp promoter of maize phosphatidylinositol synthase gene (ZmPIS) which confers high-level gene expression and salinity or osmotic stress inducibility in transgenic tobacco. *Frontiers in Plant Science* (2016) 7: 42.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. *Agrobacterium*-mediated transformation of *A. thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* (2006) 1:641–646.



Contents lists available at ScienceDirect

Agri Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aggene

Functional characterization of the *Arabidopsis* actin 2 promoter in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) flowers and bolls



Estela Reis de Andrade^{a,b}, Francisco José Lima Aragão^{a,*}

^a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900 Brasília, DF, Brazil

^b Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Campus Universitário, 70910-900 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Genetic manipulation
Gene expression
transgenic plants

ABSTRACT

Efforts have been made to engineer cotton to achieve resistance to the boll weevil, which is one of the most important pests impacting cotton production in the Americas. The insects feed on flowers and immature cotton bolls. Strategies for expressing insecticide proteins must be associated with a strong expression in these tissues. The expression of the *gus* gene driven by the *ACT2* promoter from *Arabidopsis thaliana* was compared to the 35SCaMV promoter in leaves, roots, petals and fiber of transgenic cotton plants. Fluorometric and histochemical analyses have shown that the *ACT2* promoter produced a strong expression in floral and boll tissues, including pollen, petals, ovules and fiber. It revealed the potential of using the *ACT2* promoter to express genes involved with boll weevil resistance.

The development of transgenic organisms is based on the development of methods involving the control of transgene expression. Thus, there have been intensive efforts to identify suitable promoters – sequences that are typically located upstream immediately adjacent to the gene – that contain specific domains recognized by proteins involved in the initiation and regulation of transcription. The identification of functional promoters allows desirable gene expression in specific tissues and conditions, which is crucial for manipulation using genetic engineering. This approach allowed the manipulation and analysis of biochemical processes, and permitted integration and study of genes that cannot be manipulated by classical breeding (Shah et al., 2015).

Based on their activity, promoters can be classified as constitutive, tissue-specific and inducible. A constitutive promoter contains elements recognized by activators to initiate transcription in all tissue types permanently (Singhal et al., 2016). Strong constitutive promoters of plant origin have been isolated and used for the development of transgenic plants. Actin (ACT) is a fundamental cytoskeleton component of all eukaryotic cells, except nematode sperm. The actin gene (*ACT2*) promoter from *Arabidopsis thaliana* showed strong expression in both monocots (such as rice and maize) and dicots (such as peanut and soybean) (Aragão et al., 2000; He et al., 2009; Yang et al., 2003). The *A. thaliana* genome encodes a family of eight globular multi-functional actin proteins, which are categorized into two major classes: vegetative and reproductive. *ACT2* and *ACT8* are included in the vegetative class

(An et al., 1996).

Significant efforts are being made to genetically modify cotton in order to achieve resistance to the boll weevil (*Anthonomus grandis*), which is one of the most destructive pests that impair cotton production in the Americas (EFSA Panel on Plant Health (PLH) et al., 2017). The insect feeds on flowers and immature cotton bolls. Consequently, strategies for expression of insecticide protein-coding genes must be associated with a strong expression in floral and fruit tissues. Here we studied the expression of the *gus* reporter gene, controlled by the *ACT2* promoter, in cotton flowers and bolls during the development.

Cotton (var. 7MH) was genetically transformed according to Aragão et al., 2005 (Aragão et al., 2005) with the plasmid vectors pAG1 and pAHAS35SGUS, containing the *gus* gene under control of the *ACT2* promoter (1402 bp; NCBI Sequence ID: gi|332,640,072|CP002686.1, position 6,475,534 to 6,475,133) from *A. thaliana* (*ACT2::gus*) and the Cauliflower mosaic virus 35S promoter (35SCaMV) (35SCaMV::gus), respectively. Both vectors contain the *ahas* cassette that confers tolerance to imidazolinones (Aragão et al., 2005). Ten plants from three independent lines were used to quantify the *gus* gene expression in leaves, roots, fiber and petals using the fluorometric assay according Sunilkumar et al., 2002 (Sunilkumar et al., 2002). Homozygous plants of the line 20/4 (transformed with the pAG1) were identified in the T₂ generation. Plants were cultivated under greenhouse conditions until the T₄ generation, which was used for evaluation of *gus* expression in

Abbreviations: *ACT2*, actin 2 gene promoter from *Arabidopsis thaliana*; T₂ generation, second generation of transgenic plants; T₄ generation, fourth generation of transgenic plants

* Corresponding author.

E-mail address: francisco.aragao@embrapa.br (F.J.L. Aragão).

<https://doi.org/10.1016/j.aggene.2018.07.002>

Received 21 May 2018; Received in revised form 12 July 2018; Accepted 14 July 2018

Available online 17 July 2018

2352-2151/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

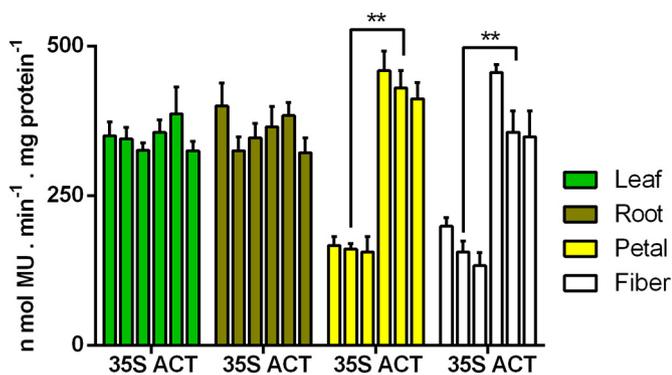


Fig. 1. Quantitative assays of GUS specific activity in leaves, roots, petals and fiber (30 days after anthesis) from progeny (T₄ generation) of three independent transgenic cotton lines transformed with the *gus* gene driven by the 35SCaMV (35S) and *ACT2* (ACT) promoters. Data shown are presented as the mean ± SEM of ten plants from three independent lines. Mean are compared using a Student's *t*-test. ***P* < .01, *n* = 30 (mean within a 35S or ACT group).

flowers and bolls using the histochemical assay performed according to Aragão et al., 2005 (Aragão et al., 2005). The reproductive tissues (flowers and bolls in different stages of development) were sectioned by hand.

The expression of the *gus* gene driven by the 35SCaMV (35SCaMV::*gus*) and *ACT2* (*ACT2*::*gus*) promoters was quantified in

cotton lines (T₄ generation; homozygous). Results revealed that the 35SCaMV::*gus* presented similar expression levels in leaf and roots when compared to the *ACT2*::*gus* (Fig. 1). However, plants transformed with the *ACT2*::*gus* cassette presented higher *gus* gene expression than those transformed with the 35SCaMV::*gus* in petal (2.7 fold) and fiber (2.3 fold) (Fig. 1).

Histochemical GUS analyses revealed that the *ACT2* promoter was strong in cotton floral tissues, including pollen, petals and ovules (Fig. 2). GUS activity was observed during all stages of flower development (from 18 to 5 days before anthesis and on the day of anthesis) as observed by the intense blue coloration (Fig. 2). Expression of genes for controlling boll weevil in microspores and pollen grains is important for the development of effective control, because female boll weevil ovary development depends on a pollen diet. Fig. 3 shown *gus* gene activity in all stages of cotton boll development (from 3 to 33 days after anthesis), especially the fiber (Fig. 3 F–H), which suggests that this promoter can be used to provide new molecular tools for studying fiber development and may be used in the genetic manipulation of fiber quality. Cotton fiber (lint) yield and quality are two primary factors determining the economic outcomes for cotton producers and are critical for the textile industry (Kothari et al., 2017). Many factors can affect and severely reduce the lint yield, such as insects, virus, drought, temperature and salinity.

The results presented here revealed the potential of using the *ACT2* promoter to control the expression of genes involved with boll weevil resistance. The *ACT2* promoter was active in tissues that are coincident

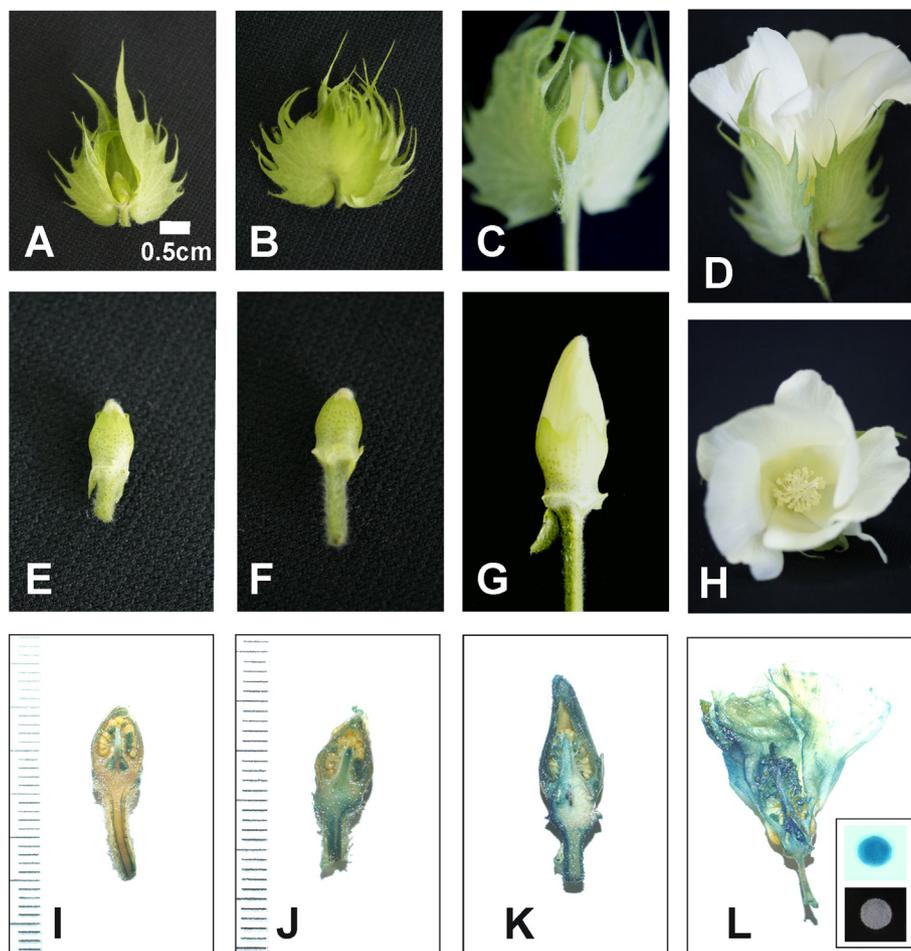


Fig. 2. Histochemical localization of *gus* gene expression controlled by the *ACT2* promoter in transgenic cotton (T₄ generation) floral tissues. Flowers were analyzed 18 (A, E and I), 10 (B, F and J) and 5 (C, G and K) days before anthesis; and on the day of anthesis (D, H and L). A, B, C and D are flowers with all structures, E, F, G and H are flowers without sepals; and I, J, K and L are flowers without sepals used for the GUS assay. The small inner box in L shows a detail of a transgenic pollen showing *gus* expression (upper) and a non-transgenic pollen (down). Bar in A represents the scale in all figures, except the inner box in L.



Fig. 3. Histochemical localization of *gus* gene expression controlled by the *ACT2* promoter in transgenic cotton (T_4 generation) bolls. Bolls were analyzed 3 (A and E), 6 (B and F), 28 (C and G) and 33 (D and H) days after anthesis. Bar in A represents the scale in all figures.

with those fed on by insects during their life cycle. In addition, this promoter could be used to express genes for manipulations of fiber quality, virus resistance and other agronomic traits.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, Brazil (grant number 303551/2013-5). E. R. Andrade was supported by a fellowship from Instituto Mato-Grossense do Algodão (Brazil).

References

- An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S., Meagher, R.B., 1996. Strong constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10, 107–121.
- Aragão, F.J.L., Sarokin, L., Vianna, G.R., Rech, E.L., 2000. Selection of transgenic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1–6.
- Aragão, F.J.L., Vianna, G.R., Carvalheira, S.B.R.C., Rech, E.L., 2005. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Sci.* 168, 1227–1233.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Gregoire, J.-C., Jaques, J.A.M., Navarro, M.N., Niere, B., Parnell, S., Potting, R., Rafoss, T., Rossi, V., Urek, G., Van Bruggen, A., Van der Werf, W., West, J., Winter, S., Gardi, C., Bergeretti, F., MacLeod, A., 2017. Scientific opinion on the pest categorisation of *Anthonomus grandis*. *EFSA J.* 15, 12–14.
- He, C., Lin, Z., McElroy, D., Wu, R., 2009. Identification of a rice Actin2 gene regulatory region of high-level expression of transgenes in monocots. *Plant Biotechnol. J.* 7, 227–239.
- Kothari, N., Hague, S., Hinze, L., Dever, J., 2017. Boll sampling protocols and their impact on measurements of cotton fiber quality. *Ind. Crop. Prod.* 109, 248–254.
- Shah, S.H., Jan, S.A., Ahmad, N., et al., 2015. Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future perspectives. *Am-Euras J Agric Environ Sci* 15, 664–675.
- Singhal, P., Jan, A.T., Azam, M., Haq, Q.M.R., 2016. Plant abiotic stress: a prospective strategy of exploiting promoters as alternative to overcome the escalating burden. *Front Life Sci* 9, 52–63.
- Sunilkumar, G., Connell, J.P., Smith, C.W., Reddy, A.S., Rathore, K.S., 2002. Cotton α -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, arabidopsis, and tobacco. *Transgenic Res.* 11, 347–359.
- Yang, H., Nairn, J., Ozias-Akins, P., 2003. Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 160, 945–952.