

# Avaliação do efeito da superexpressão do gene *EgCesA3* de *Eucalyptus* na planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Marques, W.L.\*; Salazar, M.M.; Camargo, E.L.O.; Lepikson-Neto, J.; Carazzolle, M.F. & Pereira, G.A.G.  
 Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.  
 \*marques@ig.ifi.unicamp.br

## Introdução

O setor florestal contribuiu com 4% do PIB brasileiro. Além disso, no ranking mundial dos produtores de celulose, o Brasil está em 4º lugar e em se tratando exclusivamente de celulose de fibra curta (celulose de eucalipto) o Brasil é o maior produtor/exportador do mundo (Fig.1)

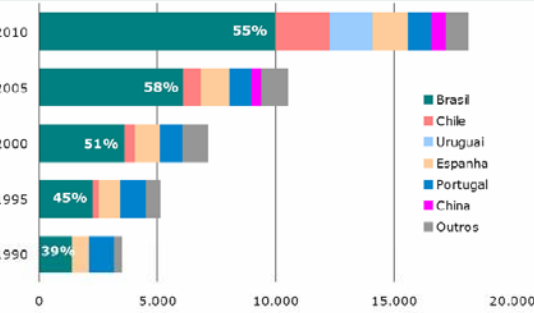


Figura 1: Brasil: líder na produção de celulose de eucalipto. Adaptado de PPPC (Pulp and Paper Products Council, 2009)

O eucalipto é a principal fonte do setor de papel e celulose pois apresenta crescimento rápido, alta produtividade

(cerca de 41m³/ha/ano, no Brasil) e boa resposta a tratamentos culturais de manejo e melhoramento genético.

Para manter a competitividade do país no setor em questão se faz necessário o melhoramento genético. Nesse sentido objetiva-se a otimização da madeira buscando-se, por exemplo, o aumento do teor de celulose e a redução do teor de lignina (Fig. 2), os dois compostos chave na produção do papel.

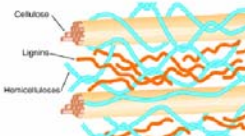


Figura 2: Representação esquemática da parede celular secundária lignificada. Imagem extraída de Boudet et al (2003).

A síntese da celulose é realizada pelo Complexo Celulose Sintase (Figs. 3, 4 e 5). Este complexo é formado por 6 subunidades catalíticas que, por sua vez, são formadas por 6 polipeptídeos. Cada complexo sintetiza uma microfibrila de celulose formada por 36 cadeias elementares de celulose.

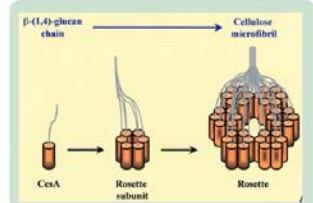


Figura 4: Um modelo da estrutura da roseta: seis subunidades, contendo seis polipeptídeos CESA cada uma. Cada polipeptídeo é envolvido na síntese de apenas uma cadeia elementar de celulose. Estas cadeias se unem por pontes de hidrogênio formando uma microfibrila de celulose com 36 cadeias. Adaptado de Doblin et al. (2002)

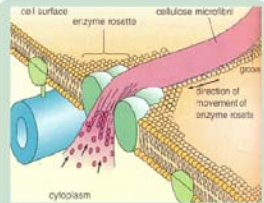


Figura 5: Esquema do movimento de um complexo celulose sintase. A trajetória seguida pela roseta é orientada pela disposição dos microtúbulos, além disso, a microfibrila de celulose que vai sendo formada a partir dos resíduos de UDP-glicose presentes no citoplasma se deposita na face externa da membrana plasmática.

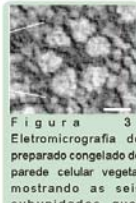


Figura 3: Electromicrografia de preparado congelado de parede celular vegetal mostrando as seis subunidades que, juntas, formam o Complexo Celulose Sintase, em forma de "roseta". Adaptado de Dotallevi, F. e Mulder, B. (2007).

Os 36 polipeptídeos que formam o Complexo Celulose Sintase são codificados, em eucalipto, por uma família de ao menos 6 genes. Em *Arabidopsis* essa família é de 10 genes dentre os quais aquele cujo knock-out resulta em maior redução do teor de celulose é o *AtCesA7* (ortólogo do *EgCesA3* de eucalipto) (Fig. 6).

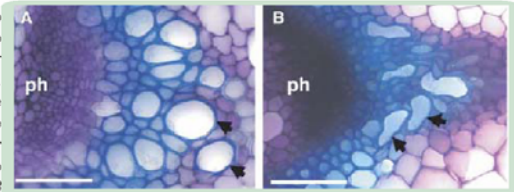
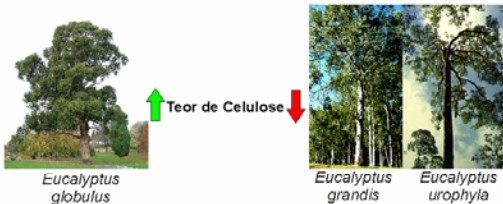


Figura 6: Seção transversal do sistema vascular de *A. thaliana* evidenciando elementos do xilema no tipo selvagem (A) e no mutante com knock-out para o gene *AtCesA7* (ortólogo do *EgCesA3*) (B) (ph floema). Adaptada de Brown et al. (2005).

O gene *Celulose Sintase 3* (*EgCesA3*), junto com o *EgCesA1* e o *EgCesA2*, está relacionado com a síntese da parede celular secundária. Desse modo ele está mais expresso no xilema do que em outros tecidos vegetais. Além disso, o *EgCesA3* é o que tem o maior grau de expressão em xilema em relação aos outros dois genes citados.

Outra dado de expressão relevante que não é conhecido se refere à análise do *EgCesA3* entre espécies de eucalipto. Isso porque a quantidade de celulose que pode ser extraída do xilema varia entre as espécies. O *Eucalyptus globulus*, por exemplo, é a espécie de melhor qualidade de madeira em comparação com as duas espécies mais cultivadas comercialmente no Brasil.



Em acordo com os consistentes dados apresentados a cima, o *EgCesA3* é acreditado como sendo o gene mais importante na formação da parede celular secundária. Em razão disso, este projeto de iniciação científica tem como objetivo central avaliar as implicações da superexpressão do gene *EgCesA3* de eucalipto na planta modelo *Arabidopsis thaliana* esperando incremento no teor de celulose.

## Material e Métodos

### Material vegetal



Mudas de *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. globulus* cultivadas em casa de vegetação (Fig. 7).

Figura 7: Mudas de eucalipto cultivadas em casa de vegetação.

### Extração de RNA

A extração do RNA de tecidos de xilema e folha das três espécies citadas seguiu o protocolo descrito por Zeng & Yang (2002). A quantificação do mesmo foi realizada por espectrometria (Nanodrop) e a avaliação da qualidade do material extraído se deu por eletroforese (Fig. 8).

Figura 8: Eletroforese de RNA extraído de mudas de eucalipto.

### Análise de expressão gênica

A síntese de cDNA (Fig. 9) (necessária para a realização do real time-PCR) foi realizada com o kit Imprim II Reverse Transcription System (Promega).



Figura 9: Eletroforese de produto de PCR realizada com cDNA para validar a presença deste último. FGL e XGL: folha e xilema, respectivamente, de *E. globulus*; FGR e XGR: folha e xilema, respectivamente de *E. grandis* e FUR e XUR idem para o *E. urophylla*.

Para detectar a fluorescência durante a amplificação em aparelho de qPCR apropriado utilizou-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O método da eficiência descrito por Pfaffl (2001) foi utilizado para tratamento dos dados de expressão gênica obtidos.

### Clonagem e transformação em Arabidopsis thaliana

O cDNA do *EgCesA3* será clonado em vetor pCAMBIA possuindo o promotor 35S e o gene de seleção NPT II. Após a inserção do vetor pCAMBIA/cDNA em linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, as plantas-modelo *A. thaliana* serão inoculadas para transformação genética. Plantas homocigotas serão semeadas em câmaras de crescimento para posterior avaliação fenotípica.

### Análises químicas e histológicas

A quantificação dos constituintes da parede celular vegetal se dará por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). As análises histológicas serão realizadas a partir de segmentos caulinares das plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com o gene *EgCesA3* de eucalipto. Estes segmentos serão coletados e fixados em soluções específicas conforme o protocolo descrito por Pitre (2007).

## Resultados e Discussão

### Expressão do gene *EgCesA3*

Em todas as três espécies de eucalipto avaliadas, o gene *EgCesA3* se mostrou mais expresso em xilema do que em folha (Fig. 10). Na espécie *E. globulus*, por exemplo, esse gene é 3683,9 vezes mais expresso no xilema do que na folha (Fig. 10). Esse dado evidentemente vai de encontro à teoria de que o *EgCesA3* esteja comprometido com a síntese da parede celular secundária (Ranik, M. & Myburg, A. 2006).

Analisando-se as três espécies entre si, obtém-se que o gene em questão apresenta expressão semelhante quando o órgão vegetal considerado é a folha. No entanto, quando é considerado o tecido xilemático, observa-se que o gene *EgCesA3* é 12,9 vezes mais expresso em *E. globulus* do que nas outras duas espécies avaliadas, sendo que, nestas duas espécies a expressão é semelhante (Fig. 10). Essa informação indica que o *EgCesA3* possa estar relacionado com a qualidade superior que a madeira de *E. globulus* têm quando comparada com a das outras espécies.

### Expressão do gene *EgCesA3*

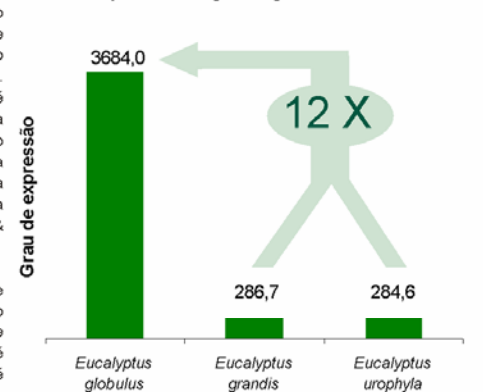


Figura 10: A expressão do gene *EgCesA3* em folha foi utilizada como referência para a construção do gráfico e corresponde ao valor zero do mesmo. As barras representam o grau de expressão do *EgCesA3* no xilema das três diferentes espécies de eucalipto avaliadas.

## Conclusão

Os resultados de expressão gênica indicam que o *EgCesA3* seja um importante gene relacionado com a síntese da parede celular secundária e, possivelmente, esteja relacionado com a qualidade superior que a madeira de *Eucalyptus globulus* tem em se tratando de fornecimento de celulose para a produção de papel.

### Referências

BLOUET, A. M.; KAJITA, S.; ORMA-PETTENATI, J.; GÖFFNER, D. Lignins and lignocellulose: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant science*, V.13(9), p. 578-81, 2002.  
 BROWN, D. M.; ZEEF, L. A. H.; ELLIS, J.; OODACORE, R. & TURNER, S. Identification of novel genes in *Arabidopsis* involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics. *The plant cell*, v. 17, p. 2261-2295, 2005.  
 DOTALLEVI, F.; MULDER, B. The Cellulose Synthase Complex: A Polymerization Driven Supramolecular Motor. *The Netherlands Biophysical Journal*, V. 92, p. 2666-2673p, 2007.  
 DOBLIN, M. S.; JURK, I.; DELMER, D. P.; JACOB-WILK, D., Cellulose Biosynthesis in Plants: From Genes to Rosettes. *Plant and Cell Physiology*, V.43(12), p. 1407-1420, 2002.  
 PFAFFL, M. W. Annonymized methods for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, V. 29, p. 2002-2007, 2001.  
 PITRE, F. E.; COHEN, J. E. K.; MACKAY, J. J. Short-term effects of nitrogen availability on wood formation and fibre properties in hybrid poplar. *Trees*, V.21, p. 249-259, 2007.  
 PPPC: Pulp and Paper Products Council - Disponível em [http://www.pppc.org/eng1\\_index.html](http://www.pppc.org/eng1_index.html) - Acessado em 29 de julho de 2008.  
 ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, V.20, p. 417-417, 2002.