

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

mestrado

BC/47769

IB/ 81729

INSTITUTO DE BIOLOGIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Marcio Kenji Fukada

Obtenção de plantas transgênicas de tabaco superexpressando os genes *Zma1*, *Zmgst2* e *OMT134*, e análise do desempenho dos transformantes frente ao Alumínio .

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Marcio Kenji Fukada</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Vegetal e melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Campinas/SP

2001

UNIDADE IB/81729
N.º CHAMADO T/UNICAMP
F955o
47769
837102
R\$ 11,00
DATA 08-02-02
M.º CPD

CM00162959-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

F955o **Fukada, Marcio Kenji**
Obtenção de plantas transgênicas de tabaco superexpressando os genes Zm11, Zmgst2 e OMT134, e análise do desempenho dos transformantes frente ao Alumínio/Marcio Kenji Fukada. -- Campinas, SP:[s.n.], 2001

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Plantas-efeito do alumínio. 2. Tabaco-transgênico. 3. Estresse.
4. Tolerância. I. Teixeira, Marcelo Menossi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 20 de Novembro de 2001-09-15

Banca Examinadora:

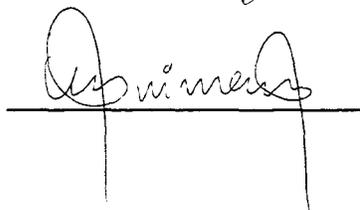
Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira (Orientador)

Handwritten signature of Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira, written in black ink on a horizontal line.

Prof. Dr. Marcelo Surpili

Handwritten signature of Prof. Dr. Marcelo Surpili, written in black ink on a horizontal line.

Profa. Dra. Cláudia Teixeira Guimarães

Handwritten signature of Profa. Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, written in black ink on a horizontal line.

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

A blank horizontal line intended for the signature of Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz.

Agradeço:

Ao prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira pela amizade, pela dedicação, pela compreensão e principalmente pelos ensinamentos durante todo este tempo, que sem dúvida nenhuma, foram essenciais para minha formação pessoal e profissional.

Ao Dr. Marcelo Surpili e a Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, por terem aceitado o convite para fazer parte da banca examinadora.

Aos professores Michel Vincentz, Renato Atílio Jorge, e Dra. Cláudia Teixeira Guimarães, pela paciência e pelas discussões durante a Pré-banca.

À Rose, pela ajuda valiosa nas análises estatísticas do trabalho.

Aos técnicos e ex-técnicos, Nilson Cremonese, Daniele Beck e Edna Santos pela ajuda essencial em várias etapas do trabalho, e principalmente pela amizade e por tornarem a vida “laboratorial” sempre mais agradável e divertida.

Às meninas da secretaria, principalmente Tânia e Sandra, pela ajuda nas burocracias laboratoriais, pelas papeladas de relatórios, etc...

À secretária da Pós-graduação Zaira, pela paciência e disposição de explicar toda papelada necessária para a Defesa da Tese.

Aos amigos de laboratório:

Juliana Felix e Lyza Maron, pela amizade e companheirismo, e pelos dias “inesquecíveis” de carnaval no milharal.

Dani Beck, Nilson, Rosandra, Kasandra, Edna, Bia, Melina, Jorge, Paulino e Boi, que em algum momento do meu mestrado sempre estiveram dispostos a ajudar, e tornar o nosso ambiente de trabalho mais divertido.

Aos amigos do genoma, Ana Luíza, Ju, Almir e Susan, pela amizade e pela ajuda nos momentos de apuros (falta de matérias, etc...).

À galera do Lab. Plantas, pela prestatividade em vários momentos do trabalho.

À minha família, meu pai Takeji, minha mãe Hisako, minha irmã Mina e minha vó Hatsu, pelo apoio constante e pela confiança depositada em mim durante mais esta etapa da vida.

À minha eterna paixão, Sayumi, que sempre esteve ao meu lado nas melhores e nas piores horas da minha vida.

Poesia

Gastei uma hora pensando um verso
que a pena não quer escrever
No entanto ele está cá dentro
inquieta, vivo
Ele está cá dentro
E não quer sair
Mas a poesia deste momento
Inunda minha vida inteira

Carlos Drummond de Andrade

Índice Geral

RESUMO.....	1
-------------	---

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais.....	2
1.2 Solos ácidos.....	2
1.3 Ação fitotóxica do alumínio sobre as plantas.....	3
1.4 Formas fitótóxicas do alumínio.....	5
1.5 Possível relação entre Al e produção de AOS.....	6
1.6 Mecanismos de tolerância ao alumínio.....	10
1.7 Os Germoplasmas Cat 100-6 e S 1587-17 de milho.....	10
1.8 Histórico de plantas transgênicas com maior tolerância ao alumínio.....	12
1.9 Genes avaliados neste trabalho:	
Gene <i>Zmal1</i>	13
Gene <i>Zmgst2</i>	13
Gene <i>OMT134</i>	14

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico.....	15
2.2 Meios de Cultura.....	15
2.3 Minipreparação de DNA bacteriano.....	15
2.4 Sequenciamento.....	16
2.5 Construções dos cassetes de superexpressão	
Gene <i>Zmal1</i>	16
Gene <i>OMT134</i>	17
Gene <i>Zmgst2</i>	17
2.6 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.7 Transformação de plantas de tabaco com <i>A. Tumefaciens</i>	18
2.8 Análise da integração dos genes.....	20
2.9 Análise de segregação dos genes.....	23
2.10 Identificação das plantas transformantes que expressam o gene inserido	
RT-PCR.....	23
Northern Blot.....	24
Western Blot.....	26
2.11 Análise da tolerância ao Al das plantas T0	
Análise de crescimento radicular.....	27

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de construções para superexpressão dos genes <i>OMT134</i> , <i>Zmal1</i> e <i>Zmgst2</i>	28
3.2 Obtenção de plantas transgênicas de tabaco.....	29
3.3 Análise das plantas transgênicas expressando o gene <i>Zmal1</i>	29
3.3.1 Análise de segregação das sementes das plantas T0 <i>Zmal1</i>	30
3.3.2 Análise da expressão do gene <i>Zmal1</i> nas plantas transformadas	
RT-PCR das plantas T1 <i>Zmal1</i>	33
Northern Blot das plantas T1 <i>Zmal1</i>	34

3.3.3	Análise da tolerância ao Al por diferença de crescimento radicular em meio de cultura das plantas T1 <i>Zmal1</i>	36
3.4	Análise das plantas transgênicas expressando o gene <i>Zmgst2</i>	41
3.4.1	Análise de segregação das sementes das plantas T0 <i>Zmgst2</i>	42
3.4.2	Análise da expressão do gene <i>Zmgst2</i> nas plantas transformadas	
RT-PCR	das plantas T1 <i>Zmgst2</i>	43
Northern Blot	das plantas T1 <i>Zmgst2</i>	45
3.4.3	Análise da tolerância ao Al por diferença de crescimento radicular em meio de cultura.....	46
3.5	Análise das plantas transgênicas expressando o gene <i>OMT134</i>	50
3.5.1	Western Blot das plantas T0 <i>OMT134</i>	51
3.5.2	Análise de segregação das sementes das plantas T0 <i>OMT134</i>	52
3.5.3	Análise da expressão do gene <i>OMT134</i> nas plantas transformadas	
RT-PCR e Northern Blot	das plantas T1 <i>OMT134</i>	53
3.6	Sumário dos Resultados.....	53
4-	CONCLUSÕES	58
5-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

Índice de Figuras

Figura 1	– Plantas de tabaco em processo de seleção. (1) e (2): Planta recém transferida para meio MS de Enraizamento, (3): Planta enraizada, pronta para ser transferida para vaso com vermiculita.....	19
Figura 2	– Plantas recém transferidas para vasos com vermiculita.....	19
Figura 3	– Plantas de tabaco possivelmente transgênicas na casa de vegetação. (1): Planta recém transferida para vaso com terra vermelha, (2): Planta de aproximadamente 2 meses cobertas com sacos de papel para evitar a fecundação cruzada.....	20
Figura 4	– Técnica utilizada para medição do crescimento radicular. Placa de Petri contendo meio MS RG, com plântulas crescidas verticalmente.....	27
Figura 5	– Esquema das construções com os genes de interesse no vetor pRT104. As regiões codificantes dos genes flanqueadas pelo promotor e porção terminal 3' de CaMV.....	28
Figura 6	– Esquema das construções no vetor pCambia 1300 e os cassetes inseridos.....	29
Figura 7	– Identificação dos transformantes por PCR das plantas T0 <i>Zmal1</i>	30
Figura 8	– Análise de segregação das sementes em meio com higromicina.....	31
Figura 9	– Identificação dos transformantes que expressam o gene <i>Zmal1</i> por RT-PCR das plantas T1 <i>Zmal1</i>	34
Figura 10	– Identificação dos transformantes que expressam o gene <i>Zmal1</i> por Northern Blot.....	35
Figura 11	– Média do crescimento radicular (4 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmal1/13</i>	38
Figura 12	– Média do crescimento radicular (7 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmal1/13</i>	39
Figura 13	– Média do crescimento radicular (11 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmal1/13</i>	40
Figura 14	– Identificação dos transformantes por PCR das plantas T0 <i>Zmgst2</i>	42
Figura 15	– Identificação dos transformantes que expressam o gene <i>Zmgst2</i> por RT-PCR das plantas T1 <i>Zmgst2</i>	44
Figura 16	– Identificação dos transformantes que expressam o gene <i>Zmgst2</i> por Northern Blot das plantas T1 <i>Zmgst2</i>	45
Figura 17	– Média do crescimento radicular (4 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmgst2/19</i>	47

Figura 18 – Média do crescimento radicular (7 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmgst2/19</i>	48
Figura 19 – Média do crescimento radicular (11 dias) em diferentes concentrações de Al, \pm desvio padrão do clone T1 <i>Zmgst2/19</i>	49
Figura 20 – Identificação dos transformantes por PCR das plantas T0 <i>OMT134</i>	50
Figura 21 – Identificação dos transformantes por <i>Western Blot</i> das plantas T0 <i>OMT134</i>	51
Figura 22 – Efeito dos transgenes no crescimento radicular das plantas <i>Xanthi</i> (controle negativo), T1 <i>Zmgst2/19</i> e T1 <i>Zmal1/13</i> em diferentes concentrações de Al, após 7 e 11 dias.	55
Figura 23 – Efeito dos transgenes no crescimento radicular das plantas <i>Xanthi</i> (controle negativo), T1 <i>Zmgst2/19</i> e T1 <i>Zmal1/13</i> em diferentes concentrações de Al, após 7 e 11 dias. O crescimento radicular de cada linhagem na ausência de Al foi considerando como 100%.....	56

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Exemplo de enzimas antioxidantes.....	7
Tabela 2 - Análise de segregação das sementes T1 <i>Zmal1</i>	32
Tabela 3 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmal1/13</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	38
Tabela 4 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmal1/13</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	39
Tabela 5 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmal1/13</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	40
Tabela 6 - Análise de segregação das sementes T1 <i>Zmgst2</i>	43
Tabela 7 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmgst2/19</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	47
Tabela 8 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmgst2/19</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	48
Tabela 9 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 <i>Zmgst2/19</i>) e selvagens (<i>Xanthi</i>). Plântulas mantidas por 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al.....	49
Tabela 10 - Análise de segregação das sementes T1 <i>OMT134</i>	52

RESUMO

O alumínio (Al) é um dos principais fatores limitantes da produção agrícola. A expressão de transgenes em plantas é uma estratégia importante para identificar novos genes com potencial biotecnológico. Assim, este trabalho constituiu na obtenção de plantas transgênicas de tabaco superexpressando os genes *Zmal1*, que faz parte da família GRP que se acumula na mucilagem que envolve a raiz, o gene *Zmgst2*, que codifica uma Glutathione-S Transferase, enzima que cataliza a conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH) com diversos compostos eletrofílicos e lipofílicos com atividade citotóxica, e o gene *OMT134* que codifica um translocador de malato mitocondrial; e avaliação da tolerância dessas plantas frente ao Al.

Neste trabalho foram obtidas plantas transgênicas contendo os genes mencionados acima, sendo que os clones T1 *Zmgst2/ 19* e T1 *Zmal1/ 13*, apresentaram tolerância ao Al significativamente maior que a linhagem não transformada Xanthi. Não foi possível obter plantas superexpressando o gene *OMT134*. Os resultados indicam que os genes *Zmgst2* e *Zmal1* podem conferir tolerância ao Al. No entanto, dado o reduzido número de plantas transgênicas com níveis significativos de expressão do gene nas raízes, será necessária a obtenção de novos transformantes para se obter uma conclusão segura.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As áreas utilizadas para cultivo de plantas podem apresentar níveis fitotóxicos de vários metais como alumínio (Al), chumbo, zinco e cádmio. O Al é o principal fator limitante para a produtividade agrícola em solos ácidos, que compreendem principalmente as regiões tropicais e subtropicais (Foy *et al.*, 1984), o que vem aumentando o interesse na pesquisa sobre a tolerância das plantas frente a este metal.

1.2 Solos ácidos

A fertilidade dos solos ácidos na presença de Al é muito baixa, o que afeta severamente a produção agrícola. Cerca de 40 % dos solos aráveis no mundo apresentam solos ácidos. Os solos ácidos são característicos de regiões com formação geológica antiga, sujeitas há um longo tempo à ação de um clima quente e úmido, características normalmente encontradas nas regiões dos trópicos. Desta forma, os solos mais encontrados nos trópicos são os chamados ultissolos e oxissolos, caracterizados pela sua acidez e alta concentração de Al. Esses solos cobrem extensas áreas da América do Sul (850 milhões de hectares), das porções centrais e sul da África (600 milhões de hectares) e da Ásia Tropical (250 milhões de hectares) (Richter e Markewitz, 1995).

Cerca de 70 % dos solos brasileiros disponíveis para a agricultura apresentam-se ácidos e saturados em Al. Estas áreas concentram-se principalmente na região amazônica e nos cerrados.

Os oxissolos e ultissolos, no entanto, apresentam outros fatores prejudiciais à sua utilização na agricultura, como:

- Baixa disponibilidade de fósforo.
- Baixa disponibilidade de nutrientes. A adição de nitrogênio é recomendada para quase todas as culturas não-leguminosas.
- Compactação excessiva. Acarretando diminuição na porosidade, diminuição da infiltração de água e aumento da erosão.
- Alta erosão. Na região de cerrado, 70 % da precipitação total está concentrada entre novembro e março, época que coincide com o início do plantio da maioria das culturas. Portanto, o solo se encontra parcialmente descoberto e sujeito à erosão.
- Predomínio das monoculturas. O cultivo contínuo da soja, associado a práticas inadequadas de manejo do solo, tem resultado na redução da produtividade e no aumento dos custos da produção (Santana e Sans, 1999).

Assim, as deficiências naturais do solo associadas às formas inadequadas de cultivo, levam à utilização de técnicas de correção do solo, como calagem, para a correção da acidez do solo (altera o pH até cerca de 20 cm de profundidade do solo), adubação e outras. Com isso, ocorre um incremento dos custos da produção de alimentos e, conseqüentemente, uma diminuição da competitividade da produção.

1.3 Ação fitotóxica do alumínio sobre as plantas

Em solos com pH neutro, o Al não exerce sua fitotoxicidade, apresentando-se na forma de aluminossilicatos, óxidos ou outros compostos insolúveis. Já em solos com pH ácido, o Al solubilizado (Al^{+3}) podendo ser absorvido ou se ligar

irreversivelmente ao íon fosfato e outros íons, impedindo a absorção destes pela raiz (Keltjens *et al.*, 1997).

Os efeitos da ação fitotóxica do Al são similares aos relacionados com a falta de nutrientes, ocorrendo geralmente um atrofiamento das folhas, ou então um enrolamento das folhas jovens e morte dos pecíolos (Foy *et al.*, 1983). O primeiro e principal sintoma da toxidez do Al é a inibição do crescimento radicular (Taylor, 1988). Esta inibição ocorre rapidamente e pode ser detectada após períodos curtos de exposição ao Al, como 1 a 2 horas, mesmo em concentrações micromolares (Ownby e Popham, 1990). O ápice radicular e as raízes secundárias têm seu crescimento inibido pelo bloqueio da divisão celular da zona meristemática. Com isso o sistema radicular é reduzido, acarretando o desenvolvimento superficial e ramificação inadequada, diminuindo o volume de solo explorado e reduzindo a eficiência da absorção de água e nutrientes pela planta.

Após exposição ao Al, as células da coifa e do meristema tornam-se vacuoladas e mostram, seqüencialmente, perda da função do complexo de Golgi, ausência de desenvolvimento dos plastídeos, alterações na estrutura nuclear, perda de citoplasma e, finalmente, desintegração da célula (Taylor, 1988). As regiões meristemáticas da raiz principal e das raízes laterais tornam-se desorganizadas, a ponto de não ser possível distinguir as células da coifa, do meristema e dos tecidos vasculares. Além disso, os sítios de erupção das raízes laterais não conseguem se desenvolver normalmente (Rao *et al.*, 1993; Taylor, 1988).

A toxidez do Al compreende efeitos de curta duração (mensuráveis após minutos de exposição ao íon) e efeitos de longa duração, que são medidos após horas, até mesmo, dias de exposição. Os efeitos tardios não são necessariamente causados diretamente pelo Al. Pelo contrário, em sua maioria são conseqüências da alteração dos diversos processos bioquímicos e fisiológicos afetados pelo Al. No entanto, de um modo geral é muito difícil diferenciar respostas iniciais relacionadas à inibição do crescimento radicular de respostas secundárias, conseqüentes dos danos iniciais gerados pelo Al. Apesar

dos dois aspectos da toxidez do Al influenciarem o crescimento das plantas em solos ácidos, esta confusão tem dificultado a determinação do mecanismo (ou mecanismos) primário pelo qual o Al exerce seus efeitos tóxicos (Rengel, 1992).

1.4 Formas fitóxicas do alumínio

O Al solúvel pode existir em diferentes formas iônicas em solução aquosa. O entendimento da especiação do Al na rizosfera é de crucial importância no estudo da sua interação com a parede celular e membrana plasmática das células e, portanto, na compreensão de sua fitotoxidez.

As espécies de Al relevantes para fitotoxidez podem ser categorizadas em diversas classes (Kochian, 1995). Com relação à solução que envolve a raiz, essas classes incluem formas livres ou mononucleares de Al^{3+} , Al polinuclear, e complexos de Al de baixo peso molecular. No citoplasma, o Al na forma de complexos macromoleculares também deve ser considerado. Em meio ácido ($\text{pH} < 4,5$), o Al se encontra na forma de um hexahidrato octaédrico, $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, convencionalmente chamado de Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. Em valores de pH acima de 5 inicia-se a formação de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (gibbsite), que é relativamente insolúvel e também limita a solubilidade dos outros monômeros de Al presentes. Em pHs superiores, como o citoplasmático ($\sim 7,4$), o íon $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ é o predominante.

Quando ocorre um aumento na atividade iônica do Al, particularmente em condições parcialmente neutras, formas polinucleares contendo mais de um átomo de Al podem se formar. Destas, a mais importante é $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}]$, conhecida como Al_{13} . O Al_{13} parece ser muito mais tóxico para as espécies de plantas testadas que o Al^{3+} (Parker *et al.*, 1988). No entanto, a ocorrência do Al_{13} na natureza não foi comprovada, sendo incerta sua contribuição para a toxidez do solo.

A avaliação da toxicidade de cada espécie de Al individualmente foi abordada em diversos estudos. No entanto, diversas dificuldades técnicas, como por exemplo a falta de ferramentas para a detecção das diferentes espécies do

ion, têm comprometido a confiabilidade dos resultados. Foi sugerido que, para as dicotiledôneas, as formas $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ou $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ seriam as mais fitotóxicas, e que o Al^{3+} seria bem menos tóxico (Alva *et al.*, 1986). Já em trigo (*Triticum aestivum* L.) foi comprovado que o Al^{3+} é a espécie fitotóxica (Parker *et al.*, 1988). Esta diferença entre monocotiledôneas e dicotiledôneas é intrigante, particularmente porque é sabido que os cátions trivalentes costumam ser mais fitotóxicos que os monovalentes ou divalentes (Kinraide, 1991). A toxidez dos monômeros de hidróxi-Al é bastante controversa e não existem evidências suficientes que a comprovem. Portanto, considerando-se que a fitotoxidez do Al^{3+} já foi comprovada ao menos para trigo, esta espécie tem sido considerada como a forma fitotóxica de Al para a maioria das plantas estudadas.

De fato, foi demonstrado que monômeros de Al formam complexos de baixo peso molecular com diversos ligantes. O Al^{3+} interage preferencialmente com ligantes doadores de oxigênio como carboxilato, fosfato e sulfato. Portanto, o Al^{3+} pode formar complexos de baixo peso molecular com ácidos orgânicos, fosfatos inorgânicos, polifosfatos e sulfatos. Além disso, o Al pode se ligar reversivelmente com diversas macromoléculas, incluindo proteínas, polinucleotídeos e glicosídeos.

1.5 Possível relação entre Al e produção de espécies reativas de oxigênio

Um grande número de artigos tem sido publicado nos últimos dez anos relacionando espécies reativas de oxigênio (AOS) a determinados estímulos em plantas, em um processo conhecido como estresse oxidativo. A produção de AOS pode ser aumentada por condições abióticas, como baixas temperaturas, alta salinidade, herbicidas, secas prolongadas, radiação ultravioleta, exposição a SO_2 e ozônio. A produção de AOS também pode estar associada à exposição das plantas a metais pesados, cujos níveis tóxicos podem ser consequência da própria natureza do solo, ou então de práticas agrícolas impróprias.

Poucas publicações tratam especificamente do estresse oxidativo induzido por alumínio, os quais indicam que existe uma relação entre a toxidez

do íon Al^{+3} e a produção de enzimas relacionadas a AOS e a peroxidação de lipídios (Cakmak e Horst, 1991; Verstraeten *et al.*, 1997).

A produção de AOS provém de reações da flavina desidrogenase, transporte de elétrons na mitocôndria e fotossíntese (Lamb e Dixon, 1997), sendo um processo contínuo sob condições aeróbicas. Calcula-se que cerca de 2 % do consumo mitocondrial de oxigênio resulta na produção do íon superóxido O_2^- (Cadenas *et al.*, 1977). Apesar da moderada reatividade química do superóxido em água, este íon pode contribuir para a formação de outras espécies mais reativas, como água oxigenada (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-).

Todos os organismos aeróbicos possuem mecanismos de proteção contra os efeitos tóxicos das AOS. Uma destruição eficiente dos superóxidos (O_2^-) e do H_2O_2 está atrelada a uma ação sincronizada de diversas enzimas antioxidantes. O termo antioxidante pode ser descrito como sendo qualquer composto capaz de quelar AOS sem que se converta em um radical destrutivo. As enzimas antioxidantes são aquelas que catalizam a reação de ligação do antioxidante com o AOS, ou então aquelas que estão diretamente envolvidas no processamento de AOS, estando citadas na tabela 1.

Tabela 1 – Enzimas antioxidantes

<i>Enzima</i>	<i>Abreviação</i>
Superóxido dismutase	SOD
Ascorbato peroxidase	APX
Monodehidroascorbato redutase	MDHAR
Glutationa redutase	GR
Catalase	CAT
Glutationa peroxidase	GPX
Peroxidase	PX
Glutationa S- transferase	GST

A resistência ao estresse oxidativo induzido por fatores ambientais tem sido associada a concentrações elevadas de CAT, SOD e peroxidases. Nas plantas, a enzima SOD é a primeira enzima no processo de detoxificação, que converte rapidamente radicais O_2^- para H_2O_2 . As enzimas CAT, por sua vez, têm a função de converter o H_2O_2 em uma molécula de água e oxigênio.

Um dos principais mecanismos de detoxificação de AOS é o ciclo ascorbato- glutathione. O ascorbato pode detoxificar H_2O_2 . A enzima ascorbato peroxidase (APX) utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir H_2O_2 a água, com a geração de duas moléculas de monodehidroascorbato (MDHA). O MDHA é um radical com meia-vida curta, que se não for rapidamente reduzido, é desprotonado a ascorbato e dehidroascorbato (DHA). No plasmalema e na membrana do tilacóide, o MDHA pode ser diretamente reduzido a ascorbato, onde o NADPH pode funcionar como doador de elétrons. O DHA é reduzido a ascorbato pela ação da DHA redutase, utilizando a GSH como substrato. Essa reação gera uma glutathione oxidada (GSSG), que é re-transformada em GSH pela NADPH, catalizada pela glutathione redutase (GR).

Em condições fisiológicas normais o sistema oxidante/antioxidante está em equilíbrio. Porém, sob condições nas quais um excesso de espécies reativas de oxigênio está presente, induzida por um determinado fator, instala-se um quadro de estresse oxidativo. Suas conseqüências variam de célula para célula e a mitocôndria não somente produz espécies reativas de oxigênio, como também é o sítio primário da toxidez, conforme Gille e Sigler (1995). Um dano importante relatado é a liberação descontrolada de cálcio pela mitocôndria e inibição da síntese de ATP (Richter e Kass, 1991). Em células endotélicas, H_2O_2 provoca uma redução nas concentrações de glutathione e ATP (Spragg *et al.*, 1985), liberação de cálcio, aumento da permeabilidade da membrana (Yamada *et al.*, 1990) e danos aos mecanismos de transdução de sinal (Vercellotti *et al.*, 1991; Ryter e Tyrrell, 1998).

Espécies reativas de oxigênio podem causar danos às membranas (Yermiyahu *et al.*, 1997; Ishii *et al.*, 1997; Kristian e Siesjo, 1998) por meio da peroxidação de lipídeos, oxidação de lipídeos e inibição da metilação de

fosfolipídeos, processo importante para o ajuste da fluidez da membrana e para a atividade de enzimas ligadas a ela (Kaneko *et al.*, 1990). Apesar dos danos causados a lipídeos e proteínas serem parcialmente reparados por novas sínteses, os danos causados ao DNA comprometem a habilidade sintética das células e sua replicação. Além disso, ocorre uma diminuição significativa nos NAD^+ e ATP, o que pode provocar a morte da célula (Berger, 1991).

Cakmak e Horst (1991) estudaram o efeito do alumínio na peroxidação de lipídeos e nas atividades de superóxido dismutase (SOD), catalase e guaiacol peroxidase em pontas de raízes de um cultivar de soja sensível ao alumínio. A peroxidação de lipídeos aumentou significativamente somente após 24 horas de tratamento com $40 \mu\text{M}$ de AlCl_3 e foi estimulada na presença de ferro. A atividade de SOD também aumentou, indicando que o íon superóxido estava presente dentro da célula em maior quantidade após tratamento com alumínio. Além disso, a atividade da peroxidase foi acentuada tanto em tratamentos com baixa concentração de alumínio quanto em tratamentos mais curtos. No entanto, os autores não fizeram o mesmo estudo em um cultivar tolerante, o que poderia fornecer uma melhor discussão dos resultados com relação à toxidez ao alumínio.

Um estudo sobre a capacidade do Al^{+3} , além de outros íons metálicos como Ga^{+3} e La^{+3} , em promover danos oxidativos às membranas de cérebros de ratos foram feitos por Verstraeten *et al.* (1997), que observaram um aumento na peroxidação de lipídeos e carbonilas associadas a proteínas da mielina e em membranas sinápticas, *in vivo* e *in vitro*. Os autores propuseram que esses metais formam agrupamentos de fosfolipídeos negativamente carregados nas membranas que promovem reações de redução. Segundo Levine *et al.* (1990), a introdução de grupos carbonílicos em resíduos de aminoácidos de proteínas é característica de uma modificação oxidativa.

Richards *et al.* (1998), analisando mudanças nas expressões genéticas de *Arabidopsis thaliana* após 2 horas de tratamento com alumínio, observaram que dos genes induzidos, 4 são conhecidos por serem induzidos em condições

de estresse oxidativo, sendo uma delas uma GST, indicando que os íons alumínio promovem um quadro de estresse oxidativo nas células da planta.

Assim, os resultados mostrados na literatura apontam para uma relação entre estresse oxidativo e o efeito tóxico dos íons alumínio.

1.6 Mecanismos de tolerância ao alumínio

Existem algumas espécies de plantas que são tolerantes a quantidades usualmente fitotóxicas de alumínio. Em termos gerais, a tolerância tem sido classificada em: mecanismos de exclusão de alumínio das raízes e mecanismos de resistência interna, nos quais o Al é tolerado no citosol. Os mecanismos de exclusão compreendem a imobilização do íon nas paredes celulares, efluxo ativo do íon (Taylor, 1991), aumento do pH na rizosfera (Degenhardt *et al.*, 1998) tornando o alumínio insolúvel (Myasaka *et al.*, 1989), e liberação de ácidos orgânicos, principalmente cítrico e málico, que complexariam o íon na rizosfera, reduzindo sua atividade. Este último tipo de mecanismo foi observado em várias plantas (Delhaize *et al.*, 1993; Pellet *et al.*, 1995; Jorge e Arruda, 1997; Larsen *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1998).

Mecanismos de tolerância interna também têm sido propostos, como a complexação do Al^{+3} por polipeptídeos (Basu *et al.*, 1994), compartimentalização no vacúolo (Taylor, 1991) e síntese de proteínas (Somers e Gustafson, 1995). Contudo, não existem evidências diretas destes mecanismos e os trabalhos sobre tolerância ao íon Al^{+3} a nível intracelular são escassos.

1.7 Os germoplasmas Cat 100-6 e S 1587-17 de milho

A partir da cultura de células da linhagem de milho tolerante ao Al Cat100-6, Moon *et al.* (1997) obtiveram um variante somaclonal sensível ao Al, denominado S1587-17. Ao longo de um período de 7 dias de exposição ao Al^{3+} observou-se uma diminuição progressiva do crescimento radicular em plantas do somaclone S1587-17, enquanto que em plantas da linhagem Cat100-6 não se

observou nenhum efeito significativo. Essa diminuição, segundo os autores, estava associada à destruição do meristema radicular.

Levando-se em conta as concentrações típicas de ácidos orgânicos e o pH do meio intracelular (7,0 - 7,5), o Al presente no citoplasma está provavelmente na forma de complexos Al-ácido orgânico (Martin *et al.*, 1992). Estes fatores, associados às evidências de que o Al afeta a permeabilidade da membrana (Deleers *et al.*, 1986), tornam mais provável que o íon atue na membrana plasmática. Estudos demonstraram que existe uma forte interação entre o Al e componentes lipídicos da membrana, principalmente com o elemento de transdução de sinal fosfatidil inositol-4,5- bifosfato (Jones *et al.*, 1997). Além disso, existem evidências da interação do Al com outros elementos associados às vias dos fosfoinosídeos, como proteína G e fosfolipases C (Haug *et al.*, 1994). Jorge *et al.* (2001) analisaram a exsudação de ácidos orgânicos em milho, na linhagem Cat100-6 e no somaclone S1587-17. Dentre os ácidos orgânicos analisados, o malato e o citrato foram detectados em plantas expostas ao alumínio. Constatou-se que na linhagem sensível (S1587-17) a exsudação de citrato não sofreu alteração em resposta a concentrações crescentes de alumínio, enquanto a linhagem Cat100-6 respondeu ao aumento da concentração de alumínio aumentando a excreção de citrato. Numa atividade de $16,2 \times 10^{-6}$ do íon Al^{3+} , a linhagem tolerante excretou 3,7 vezes mais citrato do que o mutante sensível.

Com base nesses resultados e levando em consideração que a constante de ligação Al-citrato é aproximadamente 1000 vezes maior que a de Al-malato, pode-se inferir que a resistência ao Al observada em Cat100-6 está provavelmente associada a um processo de exclusão, mediado pela exsudação de citrato pela raiz. Estudos em feijão mostraram que a exsudação de ácido cítrico foi estimulada pela presença do Al e que a linhagem resistente à presença do Al excretou 10 vezes mais ácido cítrico do que as linhagens sensíveis (Miyasaka *et al.*, 1991). Esta estratégia de resistência foi observada também em outros germoplasmas de milho (Pellet *et al.*, 1995; Jorge e Arruda, 1997). Por outro lado, estudos em trigo demonstraram que o malato é o principal

ácido orgânico envolvido na resistência ao Al (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995).

1.8 Histórico de plantas transgênicas com maior tolerância ao alumínio

Estudos com plantas transgênicas de tabaco e mamão mostraram uma estratégia muito interessante desenvolvida recentemente pelo grupo mexicano liderado pelo Dr. Herrera-Estrella que superexpressaram a enzima citrato sintase (CS) de *Pseudomonas aeruginosa* (La Fuente *et al.*, 1997). O conteúdo de citrato intracelular e a conseqüente velocidade de liberação deste ácido orgânico nas raízes destas plantas são muito superiores ao de plantas selvagens. O crescimento radicular destas plantas em presença de Al é bem menos afetado que o de plantas selvagens, possivelmente devido à forte interação citrato-Al.

Apesar dessas evidências, Delhaize *et al.* (2001) obtiveram novas plantas de tabaco superexpressando citrato sintase de *P. aeruginosa*, e analisaram inclusive a linhagem obtida por Herrera-Estrella, obtendo resultados contraditórios, onde essas linhagens não apresentaram aumento na acumulação de citrato nas raízes, nem aumentaram o efluxo de citrato quando em contato com Al.

Em um outro estudo foram obtidas plantas transgênicas de tabaco que superexpressavam o gene metalotionina-I de camundongo, tendo sido demonstrado que as plantas transgênicas de tabaco eram mais resistentes ao metal cádmio, possivelmente devido à ação quelante desta proteína (Pan *et al.*, 1994).

Há alguns anos, o nosso laboratório tem concentrado seus estudos em genes relacionados com a tolerância ao Al. Inicialmente, genes induzidos por Al foram isolados utilizando a técnica de “display” diferencial de RNA, e alguns genes foram obtidos com o auxílio da técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*).

Assim, este trabalho constituiu na obtenção de plantas transgênicas de tabaco superexpressando os genes *Zma11*, *Zmgst2* e *OMT134*. Os possíveis

papéis destes genes na tolerância e resistência das plantas frente ao Al serão descritos a seguir.

1.9 Genes analisados neste trabalho:

Gene *Zmal1*

O gene *Zmal1* (de *Zea mays* aluminum-induced) foi isolado por “display” diferencial, e os transcritos se acumulam principalmente nas células da epiderme do ápice radicular, e em menores quantidades nas células da coifa. O cDNA contém uma ORF de 588 pb que codifica uma proteína de peso molecular deduzido de 17,5 KDa, com alto conteúdo de glicina (30,9 %) e serina (21,6 %). Os resultados indicam que *Zmal1* faz parte da família de GRPs (*Glicin Rich Proteins*) que se acumula na mucilagem que envolve a raiz. Sugere-se que níveis aumentados de *Zmal1* em resposta ao Al poderiam causar alterações nas propriedades físicas e/ou químicas da mucilagem, aumentando a proteção da raiz contra a abrasão causada pelo solo, e assim, favorecendo o crescimento radicular. Estas alterações poderiam também diminuir a difusão dos compostos exsudados pela raiz, como os ácidos orgânicos, que são capazes de quelar o Al^{+3} no espaço extracelular (Maron *et al.*, em preparação).

Estudos mostram que algumas GRPs com resíduos de tirosina podem se ligar facilmente a resíduos aromáticos de lignina, proporcionando a formação de uma rede. Assim, o gene *Zmal1* (contendo 7,5 % de tirosina) pode estar envolvido no aumento da resistência ao Al, proporcionando uma mudança nas propriedades da parede celular.

Gene *Zmgst2*

O gene *Zmgst2* foi isolado por RACE, e é um gene induzido por Al, que codifica a Glutathione-S Transferase (GST). Essa enzima cataliza a conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH) com diversos compostos eletrofílicos e lipofílicos

com atividade citotóxica (Mannervik *et al.*, 1988; Pickett *et al.*, 1989). Esses conjugados são então transferidos para o vacúolo ou para o exterior da célula (Marrs *et al.*, 1996). As GSTs podem desempenhar um papel importante durante o estresse causado por metais que geram espécies ativas de oxigênio (AOS). As AOS levam à produção de determinados compostos eletrofílicos que são extremamente tóxicos para as células (Sandermann *et al.*, 1992).

Considerando que tanto o cádmio como o cobre pode causar a produção de AOS (Marrs *et al.*, 1996), é plausível supor que o Al também o faça. Comprovadamente, o Al causa peroxidação em lipídeos de vesículas de fosfolipídeos (Foy *et al.*, 1983). Assim, o aumento no acúmulo de RNA mensageiro que codifica a GST poderia ter um efeito positivo nos níveis da enzima que, conseqüentemente, aumentaria a capacidade de inativar os compostos eletrofílicos através da reação com a GSH. Estudos com *arabidopsis* transgênicas superexpressando o seu próprio gene GST, demonstraram, que ocorre um pequeno aumento da tolerância ao Al (Ezaki *et al.*, 2000).

Gene *OMT134*

OMT134 é um gene nuclear que codifica um translocador de malato mitocondrial de uma espécie de gramínea (*Panicum miliaceum*), cedido pelo Dr. M. Taniguchi (Universidade de Nagoya, Japão). O gene é expresso em raízes de milho e a reconstituição da proteína em lipossomos mostrou que este translocador é capaz de transportar malato e citrato em troca de 2-oxoglutarato (Taniguchi *et al.*, 1996). A superexpressão deste translocador na membrana da mitocôndria poderia levar a um aumento na concentração de malato no citoplasma da célula e, conseqüentemente, a uma maior liberação de malato para o meio extracelular, a exemplo do observado na superexpressão de citrato sintase em tabaco. O malato no meio extracelular poderia se ligar ao Al atenuando os efeitos fitotóxicos deste íon, como verificado em linhagens tolerantes de trigo (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995) e em plantas de tabaco superexpressando o gene da citrato sintase (La Fuente *et al.*, 1997).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Os experimentos de transformação empregaram plantas de tabaco da linhagem selvagem Xanthi, gentilmente cedidas por L. Herrera- Estrela (CINVESTAV, México).

2.2 Meios de cultura

MS0: 4,3g/L de sais MS (Gibco), 1mL/L de vitaminas B5 (100 mg/mL de mio-inositol, 10 mg/mL de tiamina-HCl, 1 mg/mL de ácido nicotínico e 1 mg/mL de piridoxina-HCl), 30 g/L de sacarose e 0,8 % de agar, ajustados a pH 5,7 com KOH.

MS104: MS0 acrescido de 1 µg/mL de benziladenina (BA) e 0,1 µg/mL de ácido naftalenoacético (NAA).

MS de seleção: MS104 acrescido de 500 µg/mL de carbenicilina e 300 µg/mL de higromicina.

MS de enraizamento: MS0 acrescido de 500 µg/mL de carbenicilina e 300 µg/mL de higromicina.

MS RG: 1,075 g/L de sais MS, 1mL/L de vitamina B5, 10 g/L de sacarose e 1 % de ágar, ajustados a pH 4,3 com KOH.

2.3 Minipreparação de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método alcalino, segundo o protocolo descrito pelo fabricante Qiagen (EUA).

2.4 Seqüenciamento

As reações foram realizadas com 500 a 800 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 4 μ L de mistura de reação Big Dye Terminator (ABI-PRISM, EUA) em um volume final de 15 μ L.

O perfil de amplificação foi de 96 °C por 1 min 30 s seguidos de 25 ciclos de 96 °C por 12 s, 50 °C por 6 s e 60 °C por 4 min. Os produtos das reações foram purificados adicionando-se 80 μ L de isopropanol 75 % e incubando-se à temperatura ambiente por 15 min. As reações foram centrifugadas por 20 min a 15000 rpm. Aos peletes foram adicionados 250 μ L de isopropanol 75 %, centrifugando-se por mais 5 min. Os peletes, após secos a vácuo, foram ressuspensos em 15 μ L de tampão de corrida e mantidos a 4 °C até a amplificação no seqüenciador ABI PRISM 310.

2.5 Construções dos cassetes de superexpressão

As regiões codificadoras dos genes *Zmal1*, *Zmgst2* e *OMT134* foram clonadas entre o promotor 35S e a porção terminal 3' do plasmídeo pRT104. Objetivando a transformação de plantas de tabaco, os cassetes (compostos pelo promotor, região codificadora do gene e porção terminal do promotor) foram inseridos no plasmídeo pCambia 1300, que apresenta um gene de resistência a higromicina para seleção das plantas transformadas e um sítio múltiplo de clonagem de pUC18. Toda metodologia de construção e clonagem foi feita como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Gene Zmal1

A partir de cDNA completo obtido por RACE (Maron *et al.*, manuscrito em preparação), foi realizada uma amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores Zamino-pet (5'AGCccatggCAGGAAAAAAGCT3') e Zcarboxi-pet (5'TGCCagatctTT AGATATAGAAATTAGGGGTAG3') que flanqueiam a região

codificadora do gene, contendo em sua seqüência sítios de restrição para as enzimas *NcoI* (em vermelho e minúscula) e *BglII* (em azul e minúscula). O DNA amplificado foi digerido com *NcoI* e *BglII* e clonado no vetor pRT104 previamente digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* (que apresenta a mesma extremidade coesiva da enzima *BglII*). O clone pRT104*Zma1* obtido foi digerido com *HindIII* para liberar o cassete de superexpressão, que foi então clonado no vetor pCambia 1300 previamente digerido com a mesma enzima.

Gene OMT134

O cDNA do gene *OMT134*, inicialmente clonado em pBluescript KS, foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores *OMT5* (5' TCccatggCGGACGCCAAGCAGCA3') e *OMT3b* (5' CCtctagaAATCTTAAAGTCCCATATCCT3') que flanqueiam a região codificadora do gene, contendo em sua seqüência sítios de restrição para as enzimas *NcoI* (em vermelho e minúscula) e *XbaI* (em azul e minúscula). O DNA amplificado foi digerido com *NcoI* e *XbaI* e clonado no vetor pRT104, digerido com as mesmas enzimas. O clone *pRT104OMT134* obtido foi digerido com *HindIII* para liberar o cassete de superexpressão, que foi então clonado no vetor pCambia 1300 digerido com a mesma enzima.

Gene Zmgst2

A clonagem do cDNA completo foi realizada pelo método da RACE. A partir desse cDNA completo clonado em pGEMT (Promega, EUA), foi realizada uma amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores *GST5pet* (5' GAACAGGACccatggCTACGCCG3') e *GST3pet* (5' agatctTCACTCCTGTTCTTGGGCG3') que flanqueiam a região codificadora do gene, contendo em sua seqüência sítios de restrição para as enzimas *NcoI* (em vermelho e minúscula) e *BglII* (em azul e minúscula). O DNA amplificado foi clonado no vetor pBluescript KS digerido com *SmaI* e desfosforilado com CIP. O clone *pBK Zmgst2* (pBluescript + *Zmgst2*) foi digerido com *NcoI* e *BglII* e clonado no vetor pRT104,

digerido com as enzimas *NcoI* e *BamHI* (que apresenta a mesma extremidade coesiva da enzima *BglII*). O clone *pRT104 Zmgst2* obtido foi digerido com *HindIII* para liberar o cassete de superexpressão, que foi então clonado no vetor *pCambia 1300* digerido com a mesma enzima e desfosforilado com CIP.

2.6 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A transferência do DNA plasmidial para células competentes de *A. tumefaciens* foi feita mediante a técnica de transformação direta, de acordo com o protocolo descrito por An *et al.* (1988).

2.7 Transformação de plantas de tabaco com *A. tumefaciens*

Para a obtenção de plantas transgênicas de tabaco foi utilizado o método de cocultivo de disco de folhas de tabaco com *A. tumefaciens* contendo o DNA desejado. A metodologia foi baseada no trabalho de Horsch (1988).

Células de *A. tumefaciens* foram inoculadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) com kanamicina (50 µg/mL) e crescidas durante a noite. Discos foliares de tabaco de 1 cm de diâmetro foram colocados em contato com as culturas de *A. tumefaciens* (diluída 10 vezes) e mantidos com a face superior voltada para baixo em meio MS104 por 2 a 3 dias. Os discos foliares foram transferidos para meio MS de seleção contendo os hormônios NAA e BAP e os antibióticos higromicina (25 µg/mL) e carbenicilina (100 µg/mL), por várias semanas. Os brotos formados foram limpos e transferidos para meio MS de enraizamento (fig. 1). As plantas foram cultivadas nesses frascos por 3 semanas.

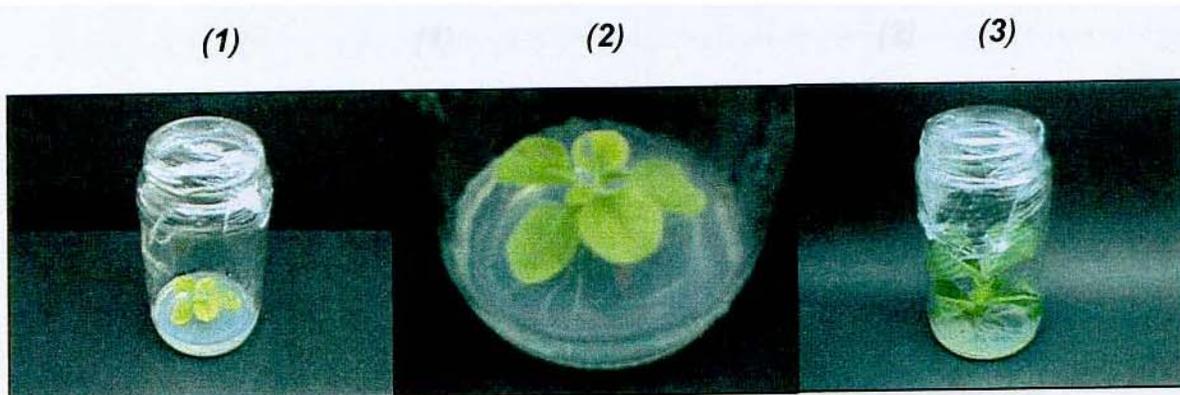


Figura 1 – Plantas de tabaco em processo de seleção. (1) e (2), planta recém transferida para meio MS de enraizamento, (3), planta enraizada, pronta para ser transferida para vaso com vermiculita.

As plantas enraizadas foram transferidas para vasos contendo vermiculita, e os vasos foram mantidos em um recipiente fechado por um filme de PVC para a manutenção da umidade (fig. 2).



Figura 2 – Plantas recém transferidas para vasos com vermiculita.

Após 5 dias, foram feitas aberturas no filme de PVC para iniciar o processo de aclimação das plantas a um novo ambiente. Após 2 semanas, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação (fig. 3).

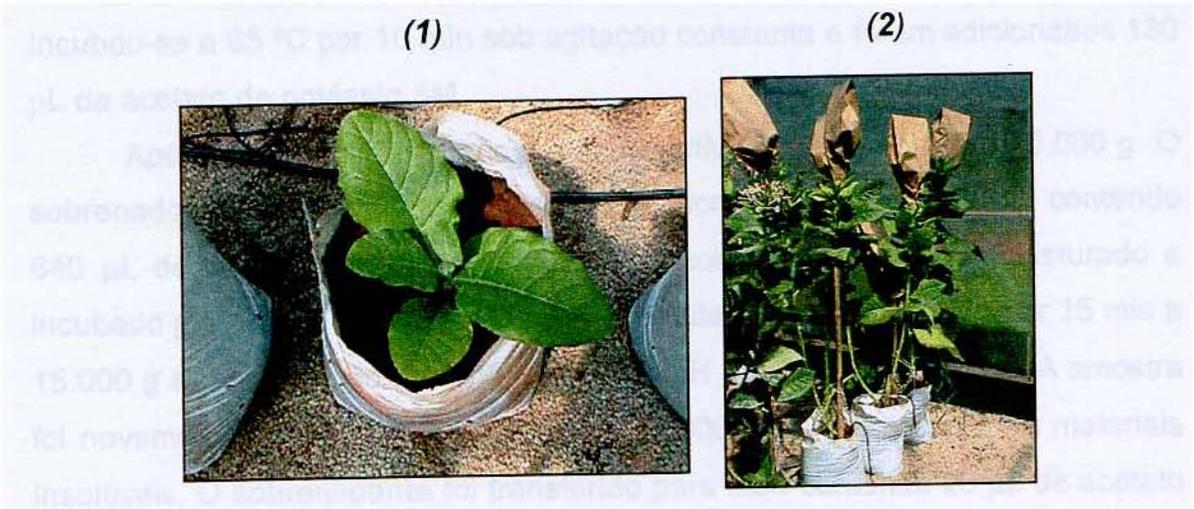


Figura 3 – Plantas de tabaco possivelmente transgênicas na casa de vegetação. (1) Planta recém transferida para vaso com terra vermelha, (2) Planta de aproximadamente 2 meses cobertas com sacos de papel para evitar a fecundação cruzada.

2.8 Análise da integração dos genes

A análise da integração dos genes foi feita, primeiramente, por PCR, utilizando DNA genômico extraído em pequena escala e oligonucleotídeos iniciadores flanqueando o gene introduzido. A eletroforese com o resultado do PCR foi transferida para membrana de náilon e hibridada com sonda correspondente à região do gene introduzido sem a região dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação.

Extração de DNA genômico em pequena escala para PCR

O DNA genômico foi extraído segundo método descrito por Ausubel (1992). Discos de tecido foliar de aproximadamente 1 cm de diâmetro foram moídos em nitrogênio líquido até a formação de um pó fino e adicionados de 500 μ L de tampão de extração (100 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM de NaCl e 10 mM β -mercaptoetanol) seguido de 35 μ L de SDS 20 %.

Incubou-se a 65 °C por 10 min sob agitação constante e foram adicionados 130 µL de acetato de potássio 5M.

Após 5 min a 0 °C, a amostra foi centrifugada por 10 min a 15.000 g. O sobrenadante foi transferido para tubo de micro-centrifuga de 2 mL, contendo 640 µL de álcool isopropílico e 60 µL de acetato de sódio 3M, misturado e incubado por 10 min a -20 °C. O DNA precipitado foi centrifugado por 15 min a 15.000 g e ressuspenso em 200 µL de Tris pH 8 e 10 mM de EDTA. A amostra foi novamente centrifugada por 5 min a 15.000 g para a retirada de materiais insolúveis. O sobrenadante foi transferido para tubo contendo 20 µL de acetato de sódio 3M e 440 µL de etanol absoluto. Após incubação de 10 min a -20 °C, a amostra foi centrifugada por 5 min a 15.000 g e lavada com etanol 70 % . O pelete foi seco e ressuspenso em 50 µL de água.

Amplificação de DNA genômico

Na reação de amplificação foram utilizados 3 µL do DNA genômico, 0,1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 80 µM de cada dNTP, 5 µL de tampão de PCR e 1,5 U de *Taq* polimerase (Pharmacia, EUA) num volume final de 50 µL. Foram utilizados 50 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 3 min. O produto da reação foi submetido à uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8 % e transferido para membranas de náilon.

Transferência do DNA para membrana

As amostras submetidas à eletroforese foram transferidas em membranas de náilon, segundo o método alcalino de Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações.

Marcação da sonda

Os fragmentos de DNA a serem utilizados como sonda foram marcados com dATP[³²P] ou dCTP[³²P] por meio da técnica de *Random Priming*, utilizando-se o Kit Megaprime, segundo as condições sugeridas pelo fabricante (Amersham, EUA). A sonda foi purificada em mini-coluna Probe-Quant G50 (Pharmacia, EUA) e a medida de radioatividade incorporada foi efetuada através de contagem em cintilômetro.

Hibridação da membrana se náilon contendo DNA

A pré-hibridação e a hibridação foram realizadas segundo Sambrook *et al.* (1989). Depois de umedecida em 2x SSC, a membrana foi colocada em tubo de vidro para hibridação. Adicionou-se a solução de pré-hibridação contendo 5x SSC, 10x Denhardt's (1 % ficol, 1 % polivinil e 1 % albumina bovina fração V em água), 20 mM Tris HCl pH 7,5, 1 % SDS, 50 % formamida e 100 µg/mL de solução de esperma de salmão denaturado. A pré-hibridação transcorreu a 42°C durante a noite. A solução de pré-hibridação foi então substituída por solução de hibridação (5x SSC, 2x Denhart's, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 1 % SDS, 50 % formamida, 5 % sulfato de dextrano, 100 µg/mL de solução denaturada de esperma de salmão) contendo a sonda previamente denaturada por 5 min em água fervente. A hibridação foi realizada a 42 °C durante a noite.

Após a hibridação, a membrana foi lavada duas vezes por 15 min em 2x SSC e 0,1 % SDS, a temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi lavada

duas vezes por 30 min com maior estringência (0,1x SSC e 0,1 % SDS a 60 °C). A membrana foi exposta a um filme auto-radiográfico e revelada.

2.9 Análise de segregação dos genes

As sementes das plantas transformadas T0 (plantas regeneradas após transformação de discos foliares com agrobactéria e seleção dos brotos) foram semeadas em meio MS0 contendo 50 µg/mL de higromicina, a fim de se saber a segregação dos genes inseridos e o número aproximado de lócus apresentando o gene de interesse inserido no genoma das plantas. As plântulas não resistentes a higromicina apresentaram aspectos amarelados, enquanto que plântulas resistentes apresentaram fenótipos normais.

2.10 Identificação das plantas transformantes que expressam o gene inserido

Confirmada a integração do gene nas plantas transformantes, as plantas T1 (derivadas de auto-fecundação das plantas T0) foram analisadas quanto à expressão dos genes inseridos. Para tanto, foram utilizadas três técnicas: RT-PCR, *Northern Blot* e *Western Blot*, sendo esta última utilizada apenas para o gene *OMT134*.

RT-PCR

O RT-PCR é uma técnica que objetiva a amplificação de uma determinada seqüência por PCR, a partir de RNA total ou mensageiro. Assim, o RT-PCR foi realizado utilizando-se o kit *Ready To Go RT-PCR Beads* (AP Biotech, Brasil), onde cerca de 1 a 2 µg de RNA e 25 pmoles dos oligonucleotídeos iniciadores específicos foram adicionados aos tubos contendo as microesferas ressuspendidas em água DEPC. Cada microesfera do kit contém, para um volume final de 50 µL, duas unidades de *Taq* DNA polimerase,

10 mM Tris HCl pH 9, 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, Transcriptase reversa (M-MuLV), inibidor de RNase RNAGuard e estabilizadores, incluindo BSA livre de RNase e DNase. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 42 °C para a transcrição reversa, 5 min a 95 °C para inativar a transcriptase reversa, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 3 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 2 min para amplificação do fragmento esperado. O produto da RT-PCR foi então submetido à eletroforese em gel de agarose.

Northern Blot

Objetivando a confirmação dos resultados do RT-PCR, as plantas T1 foram analisadas por *Northern Blot*.

Extração de RNA

O RNA total foi extraído de acordo com Longemann *et al.* (1987). Aproximadamente 3 cm² dos tecidos foliares de tabaco foram macerados em 700 μL de tampão de extração (8M guanidina HCl, 50 mM Tris HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 50 mM β-mecaptoetanol) e uma pitada de pó de sílica. Após a maceração, foram adicionados 700 μL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e as amostras vortexadas vigorosamente. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C e a fase superior transferida para um novo tubo e adicionadas de 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguida de uma homogeneização vigorosa. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 4 °C e as fases superiores transferidas para um novo tubo. O RNA foi precipitado por duas horas a -20 °C em 0,2 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto, sendo que, após essa incubação as amostras foram centrifugadas por 10 min a temperatura ambiente e o pelete lavado 3 vezes com etanol 70 %. O RNA seco foi ressuspendido em 10 a 40 μL de água DEPC.

Transferência do RNA para a membrana

Aproximadamente 15 µg do RNA total de cada amostra foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose contendo formaldeído e o gel foi incubado por 20 min a temperatura ambiente em água DEPC e por 20 min em SSC 10x para posterior transferência em membranas de náilon Hybond N+ (ApBiotech, EUA) por capilaridade. As membranas foram fixadas por 2 horas a 80 °C.

Hibridação das membranas de RNA

A pré-hibridação e a hibridação foram realizadas segundo Sambrook *et al.* (1989). Depois de umedecida em 2x SSC, a membrana foi colocada em tubo de hibridação, onde foi adicionada solução de pré-hibridação contendo 5x SSC, 5x Denhardt's (0,1 % ficol, 0,1 % polivinil e 0,1 % albumina bovina fração V em água), 1 % SDS, 50 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 50 % de formamida deionizada e 100 µg/mL de solução de esperma de salmão denaturado. A pré-hibridação transcorreu a 42°C por no mínimo duas horas, sendo que, em seguida, foi substituída pela solução de hibridação (5x SSC, 5 % sulfato de dextran, 1 % SDS, 50 % formamida deionizada e 20 mM fosfato de sódio pH 6,8) contendo a sonda previamente denaturada por 5 min em água fervente. A hibridação foi realizada a 42 °C durante a noite.

Após a hibridação, a membrana foi lavada 20 min em 0,2x SSC e 0,1 % SDS a temperatura ambiente e, posteriormente, por 20 min a 65°C na mesma solução. A membrana foi exposta a um filme auto-radiográfico e revelada.

Western Blot

A disponibilidade de anticorpo anti-OMT, gentilmente cedido pelo Dr. M. Taniguchi (Universidade de Nagoya, Japão), possibilitou a análise das plantas T1 OMT134 por *Western Blot*.

As proteínas foram extraídas a partir de discos foliares de aproximadamente 1 cm de diâmetro macerados em tampão de extração (0,125 M de tampão de empacotamento (Sambrook *et al.*, 1989), 45 % glicerol, 2 % SDS e 5 % β -mercaptoetanol) e fervidos por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm para precipitar os compostos insolúveis e 5 μ L de cada amostra (~40 μ g) foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 14 %. O gel foi colocado em contato com uma membrana de náilon Hybond-N (AP Biotech, EUA) para transferência, fazendo-se um "sanduíche" com cinco folhas de papel Whatman (3MM) do tamanho do gel de cada lado. Tanto a membrana quanto às folhas de papel foram umedecidas com tampão de transferência (tampão Tris-glicina contendo 10 % de SDS e 20 % de metanol). A transferência transcorreu por 2 horas em um sistema de transferência 2117 Multiphor II (LKB, EUA) e a membrana foi incubada durante a noite em solução de bloqueio (tampão TBS 1x, 0,05 % Tween 20 e 5 % de leite desnatado). A membrana foi então incubada com o anticorpo primário (1:2000) (Taniguchi *et al.*, 1996) em solução TBS 1x e 5 % de leite desnatado, por 1 hora a temperatura ambiente, e lavada três vezes a cada 5 min com tampão TBS 1x. A incubação da membrana com o segundo anticorpo (1:2000), conjugada com uma fosfatase alcalina, foi feita em 1 hora a temperatura ambiente em TBS 1x e 5 % de leite desnatado, seguida novamente por três lavagens a cada 5 min com tampão TBS 1x. Após as incubações e as lavagens, a membrana foi equilibrada em solução de equilíbrio (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl) e a reação de detecção da presença do anticorpo secundário foi iniciada por adição de CSPD (1:2000). Após incubação por 5 min, a membrana foi vedada com filme de PVC, e a membrana foi exposta em cassete de auto-radiografia e revelada após cerca de 30 min de exposição.

2.11 Análise da tolerância ao Al das plantas T0

Análise de crescimento radicular

Sementes das plantas T0 e da linhagem Xanthi foram esterilizadas e semeadas em placas de Petri contendo meio MS RG, acrescidas de 25 μM de higromicina para as plantas transgênicas, e crescidas com as placas dispostas verticalmente até as raízes das plântulas atingirem cerca de três centímetros de comprimento (fig. 4).



Figura 4 – Placa de Petri contendo meio MS RG com as plântulas crescidas verticalmente.

Dez plântulas de cada planta T0 foram então transferidas para novas placas contendo MS RG acrescidos de Al nas concentrações 0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 200 μM . As plantas foram então comparadas quanto ao crescimento radicular após 4, 7 e 11 dias.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de construções para superexpressão dos genes *OMT134*, *Zmal1* e *Zmgst2*.

As regiões codificadoras dos genes *OMT134*, *Zmgst2* e *Zmal1* foram amplificadas por PCR a partir de plasmídeos contendo os cDNAs completos, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (vide material e métodos). A partir de sítios de enzimas de restrição inseridos nos oligonucleotídeos, foi possível clonar as regiões codificadoras no vetor pRT104, entre o promotor 35S do CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) e a porção terminal 3' do 35S presentes no vetor pRT104, flanqueando os genes (fig. 5).

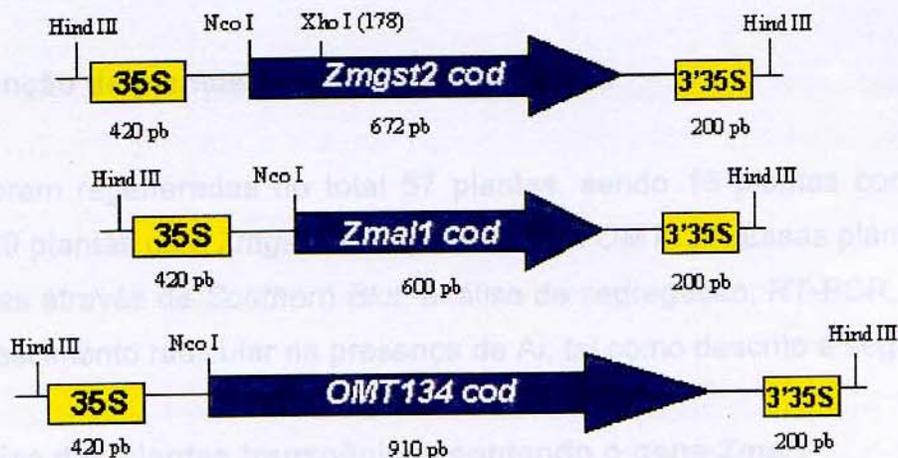


Figura 5 – Esquema das construções com os genes de interesse no vetor pRT104. As regiões codificadoras dos genes *Zmgst2*, *Zmal1* e *OMT134* estão flanqueadas pelo promotor e porção terminal 3' do 35S.

Como o vetor pRT104 não é adequado para a transformação de tabaco via *A. tumefaciens*, essas construções foram submetidas à digestão enzimática com *HindIII* com o objetivo de liberar o cassete formado pelo promotor, gene e porção terminal 3' do 35S. Os cassetes foram clonados no plasmídeo pCambia 1300 (fig. 6) para obtenção das plantas transgênicas.

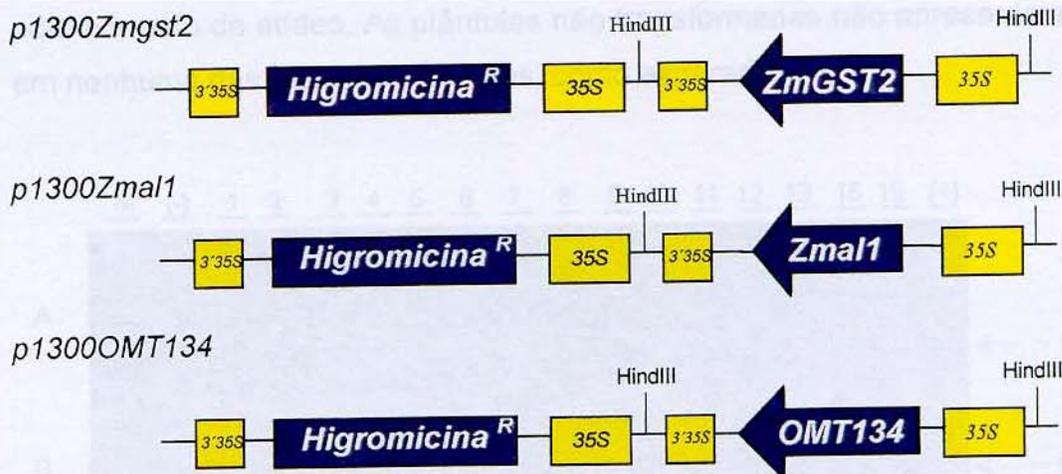


Figura 6 – Esquema das construções no vetor pCambia 1300 e os cassetes inseridos.

As construções foram transferidas para *A. tumefaciens* linhagem LBA4404 para a obtenção de transformantes estáveis de tabaco.

3.2 Obtenção de plantas transgênicas de tabaco

Foram regeneradas no total 57 plantas, sendo 16 plantas com o gene *Zmal1*, 29 plantas com *Zmgst2* e 12 plantas com *OMT134*. Essas plantas foram analisadas através de *Southern Blot*, análise de segregação, RT-PCR, *Northern Blot* e crescimento radicular na presença de AI, tal como descrito a seguir.

3.3 Análise das plantas transgênicas contendo o gene *Zmal1*

Após a análise da amplificação do fragmento de aproximadamente 600 pb, que corresponde a região codificadora do gene *Zmal1*, foi possível identificar que as plantas T0 5, 7, 9, 11, 12, 13, 15 e 16 apresentaram resultado positivo (fig. 7A), indicando a incorporação do gene de interesse no genoma. A hibridação da membrana correspondente ao gel mostrado na figura 7A permitiu confirmar esses eventos de transformação (fig. 7B), além de indicar que as plantas T0 *Zmal1*/ 3 e 4 também estavam transformadas. Este resultado provavelmente reflete a maior sensibilidade da hibridação frente à visualização

com brometo de etídeo. As plântulas não transformadas não apresentaram sinal em nenhuma das técnicas utilizadas, como esperado.

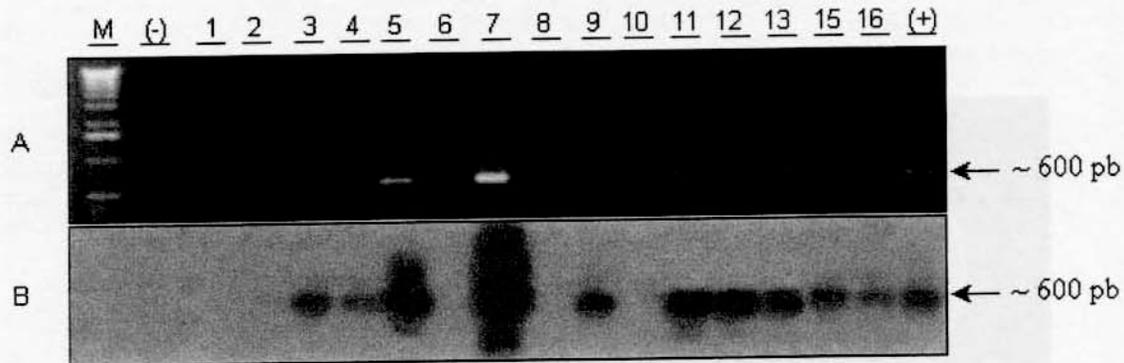


Figura 7 – Identificação dos transformantes por PCR das plantas T0 *Zma1*. A) Gel de agarose 0,8 % da amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região codificadora do gene *Zma1*. (M) Marcador de peso molecular, (-) Controle negativo, números correspondentes às plantas T0 e (+) Controle positivo (região codificadora do gene). B) Auto-radiografia da membrana contendo DNA das plantas T1 *Zma1*, hibridada com sonda da região codificadora do gene *Zma1* marcada com [³²P].

3.3.1 Análise de segregação das sementes das plantas T0 *Zma1*

Para estimar o número de lócus apresentando o gene inserido, foi feita a análise de segregação da população T1 (plântulas obtidas das sementes das plantas da geração T0) (Tabela 2). Cerca de 50 sementes foram semeadas em placas contendo meio MS e 25 µg/mL de higromicina, e após cerca de duas semanas, foram quantificadas as plantas resistentes a higromicina (apresentando fenótipos normais) e as plantas sensíveis (aspectos amarelados e pouco desenvolvidas) (fig. 8). Podemos observar na figura 8a, que existem plantas sensíveis (amareladas) e plantas resistentes (normais). Na figura 8b podemos observar plântulas não transformadas (Xanthi), sendo que todas apresentaram aspectos amarelados e pouco desenvolvidas. Em meio MS sem

higromicina não foram observadas plântulas com aspectos amarelados e pouco desenvolvidas, tanto nas transgênicas como no controle não transformado (resultados não mostrados).



Figura 8 – Análise de segregação das sementes em meio com higromicina. (a) Plântulas transformadas, resistente à higromicina e com fenótipos normais, (b) Plântulas Xanthi, não transformadas, com aspectos amarelados e pouco desenvolvimento.

Tabela 2 - Análise de segregação das sementes T1 *Zmal1* em meio contendo higromicina. A coluna p indica a probabilidade de que a razão observada não seja 1:3. ns: não significativo.

	Total de plantas	Sensíveis	Resistentes	Razão Aprox (sensível:resistente)	P
Xanthi (C. Negativo)	40	40	-		
T1 <i>Zmal1</i> / 1	41	10	31	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 2	64	16	48	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 3	42	11	31	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 4	53	14	39	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 5	57	11	46	1:4	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 6	51	14	37	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 7	40	10	30	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 8	45	12	33	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 9	52	16	32	1:2	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 10	45	9	36	1:4	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 11	51	5	46	1:9	p<0,05
T1 <i>Zmal1</i> / 12	49	14	35	1:3	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 13	50	7	43	1:6	Ns
T1 <i>Zmal1</i> / 15	36	16	20	1:1	p<0,05
T1 <i>Zmal1</i> / 16	66	33	33	1:1	p<0,05

Podemos observar na tabela 2 a análise de segregação das sementes das plantas T0 que apresenta o total de plântulas germinadas, o número de plântulas sensíveis, o número de plântulas resistentes, a razão aproximada (sensíveis:resistentes) e a probabilidade (p) de que a razão observada não seja 1:3 (1 cópia inserida), de acordo com o teste χ^2 . Assim, as plântulas cujas progênies apresentaram a segregação esperada de plântulas sensíveis e resistentes, isto é, cuja probabilidade de desvio não foi significativa (ns) pelo teste de χ^2 , indicam que provavelmente foi inserida somente uma cópia do gene. Por outro lado plantas com p<0,05 (probabilidade de a segregação ser 1:3 é menor que 5 %), indicam que estas apresentam mais de uma cópia do gene.

3.3.2 Análise da expressão do gene *Zmal1* nas plantas transformadas

Adicionalmente à análise da integração do gene *Zmal1* no genoma, foi avaliado o acúmulo de transcritos do gene nas plantas T1. Para este fim, foram utilizadas as técnicas de RT-PCR e *Northern Blot*. Como a RT-PCR é mais rápida e apresenta maior sensibilidade, ela foi a primeira metodologia testada. A expressão por *Northern Blot* foi realizada posteriormente, já que permite uma melhor avaliação dos níveis dos transcritos.

RT-PCR das plantas T1 Zmal1

A partir de 1 µg de RNA total, foi feita transcrição reversa com o oligonucleotídeo iniciador específico *Zmal1* carboxi pet seguida da reação de PCR com o mesmo oligonucleotídeo acrescido do oligonucleotídeo *Zmal1* amino pet.

As plantas T1 *Zmal1/* 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15 e 16 apresentaram resultado positivo (fig. 9), com um fragmento esperado de aproximadamente 600 pb, enquanto que as plantas T1 *Zmal1/* 2 e 10, assim como o controle negativo (partindo de RNA de Xanthi, não transformada) não apresentaram resultado negativo.

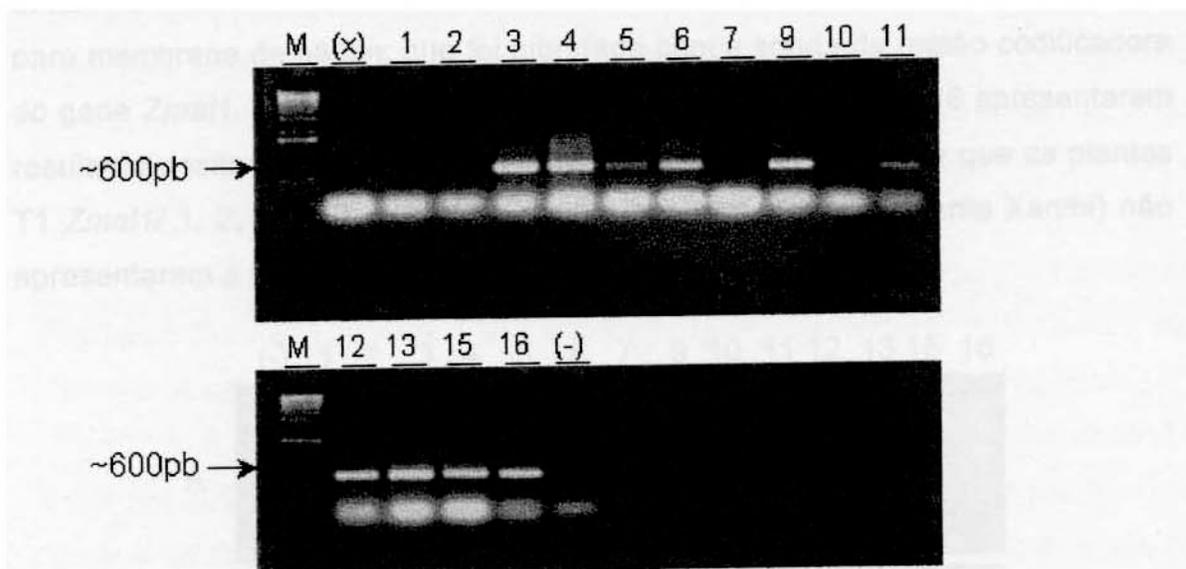


Figura 9 – Identificação dos transformantes que expressaram o gene *Zma11* por RT-PCR das plantas T1 *Zma11*. (M) Marcador de peso molecular, (x) controle negativo (RT-PCR de Xanthi não transformada), números correspondem às plantas T1 e (-) Controle negativo (kit). Gel de agarose 0,8 % da amplificação utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam a região codificadora do gene *Zma11*.

Estes resultados indicam que as plantas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15 e 16 estão expressando o gene *Zma11*, enquanto que as plantas 2, 10 e o controle negativo não expressam o gene.

Para garantir que os resultados positivos não eram consequência de contaminação do RNA total com DNA genômico, foram feitos controles negativos, nos quais os tubos do kit foram previamente incubados a 95 °C (antes de se acrescentar a amostra de RNA) para inativar a transcriptase reversa. Não se observou a amplificação de bandas no controle negativo com os mesmos oligonucleotídeos (dados não mostrados).

Northern Blot das plantas T1 Zma11

A acumulação do transcrito nas plantas foi avaliada também por *Northern Blot*. Aproximadamente 15 µg de RNA total de folha de todas as plantas T1

Zma11 foram submetidas a uma corrida eletroforética (fig. 10A) e transferidas para membrana de náilon, que foi hibridada com a sonda da região codificadora do gene *Zma11*. As plantas T1 *Zma11*/ 3, 4, 9, 11, 12, 13, 15 e 16 apresentaram resultado positivo, com banda em tamanho esperado, enquanto que as plantas T1 *Zma11*/ 1, 2, 5, 6, 7, 10 e o controle negativo (RNA da planta *Xanthi*) não apresentaram a banda esperada (fig. 10B).

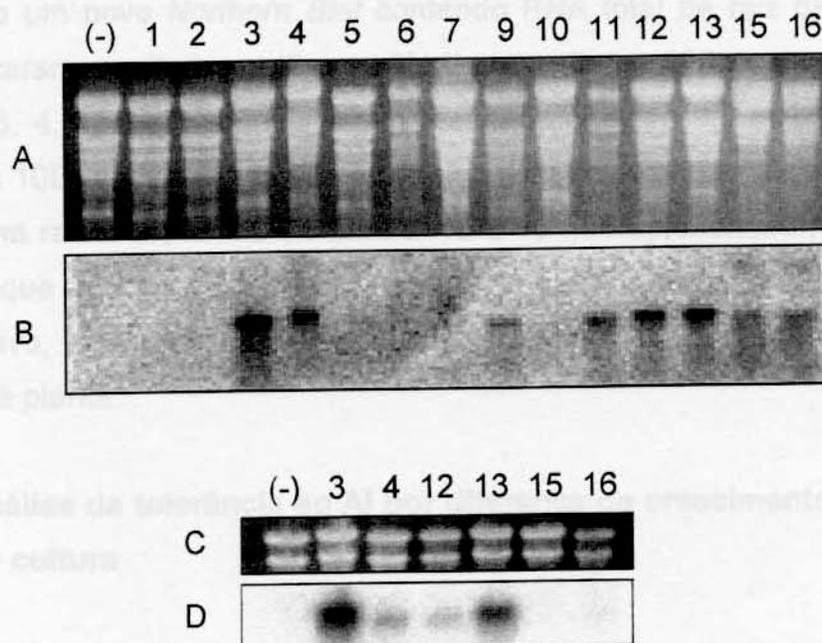


Figura 10 – Identificação dos transformantes que expressam o gene *Zma11* por Northern Blot de folha das plantas T1 *Zma11*. Os números correspondem às plantas T1 e (-) controle negativo. (A) Gel de agarose 1 % contendo formaldeído dos RNAs de folha das plantas T1 *Zma11*. (B) Auto-radiografia da membrana contendo RNA das plantas T1 *Zma11*, hibridada com sonda da região codificadora do gene *Zma11* marcada com [³²P]. (C) Gel de agarose 1 % contendo formaldeído dos RNAs de raiz das plantas T1 *Zma11*. (D) Auto-radiografia da membrana contendo RNA de raiz das plantas T1 *Zma11*, hibridada com sonda da região codificadora do gene *Zma11* marcada com [³²P].

Assim, comparando-se os resultados do RT-PCR e do Northern de folha, as plantas T1 *Zma11*/ 3, 4, 11, 12, 13, 15 e 16 apresentaram resultado positivo em ambas as técnicas, enquanto que as plantas T1 *Zma11*/ 1, 5, 6 e 10

apresentaram resultado positivo somente empregando-se RT-PCR. Esse resultado indica que nas plantas que apresentaram resultado positivo somente na RT-PCR, o nível de transcritos deve ser muito pequeno, sendo possível indentificá-los somente por esta técnica. Ainda assim, a técnica de RT-PCR é uma alternativa confiável e mais rápida para identificação de transformantes.

Para certificar-se de que a expressão do gene também ocorre na raiz, foi realizado um novo *Northern Blot* contendo RNA total de raiz das plantas que apresentaram resultado positivo no Northern da figura 10B. Assim, as plantas T1 *Zmal1/* 3, 4, 12 e 13 apresentaram resultado positivo em ambos os *Northern blots* (fig 10D), indicando que nessas plantas o gene estava sendo expresso na folha e na raiz. As plantas T1 *Zmal1/* 15 e 16 não apresentaram expressão na raiz, o que não era esperado, uma vez que o promotor 35S utilizado é constitutivo, e portanto, o gene introduzido deveria ser expresso em todas as partes da planta.

3.3.3 Análise da tolerância ao Al por diferença de crescimento radicular em meio de cultura

Um dos principais efeitos tóxicos do Al é a inibição do crescimento radicular. Dada a facilidade com que este parâmetro pode ser avaliado, ele tem sido amplamente usado para determinar a variação da tolerância de plantas frente a este íon (por exemplo, Jorge *et al.*, 2001, Ezaki *et al.*, 2000). Assim, o crescimento radicular das plantas transgênicas de tabaco foi monitorado em meio de cultura contendo 5 concentrações diferentes de Al.

Sementes das plantas Xanthi e das plantas T0 *Zmal1/* 3, 4, 12 e 13, que apresentaram maior expressão do gene, foram semeadas em placas de Petri com meio MS RG e crescidas verticalmente. As plantas T1 *Zmal1* foram avaliadas no mesmo meio MS RG contendo 25 µg/mL de higromicina, para eliminar as plantas não transgênicas, dado que a população T1 é segregante, como comprovado na tabela 2. Dez plantas de todos os clones, com raízes de aproximadamente 3 cm, foram transplantadas para meios MS RG com

diferentes concentrações de Al (0, 25, 50, 100 e 200 μ M), sendo feitas as medições após 4, 7 e 11 dias do crescimento radicular. Os resultados apresentados nas tabelas 3 a 5 e nas figuras 11 a 13, representam a média de dois experimentos da planta T1 *Zma11/13*, que foi o único clone que apresentou resultados interessantes. Embora outros clones também apresentassem expressão do gene, não foi possível observar uma melhora desses clones na tolerância ao Al.

Tabela 3 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 *Zma1/13*) e selvagens (*Xanthi*). As plântulas foram mantidas por 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) \pm desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
T1 <i>Zma1/13</i>	6,35 \pm 0,52 (a)	5,49 \pm 0,35 (b)	4,39 \pm 0,57 (c)	3,99 \pm 0,66 (d)	3,41 \pm 0,40 (e)
<i>Xanthi</i>	6,66 \pm 0,64 (a)	5,21 \pm 0,50 (b)	4,46 \pm 0,54 (c)	4,00 \pm 0,50 (d)	4,04 \pm 0,37 (d)

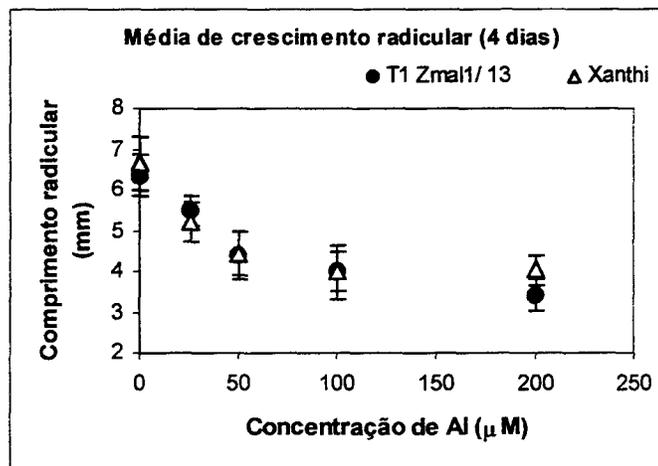


Figura 11 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zma1/13* e *Xanthi* após 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média \pm desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 3.

Tabela 4 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 *Zmal1/ 13*) e selvagens (*Xanthi*). As plântulas foram mantidas por 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) ± desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
T1 <i>Zmal1/ 13</i>	8,66 ± 0,71 (a)	7,78 ± 0,66 (e)	5,68 ± 1,36 (c)	4,56 ± 0,41 (df)	4,38 ± 0,39 (df)
<i>Xanthi</i>	8,78 ± 0,54 (a)	6,69 ± 0,62 (b)	5,59 ± 0,56 (c)	4,86 ± 0,68 (d)	4,88 ± 0,61 (d)

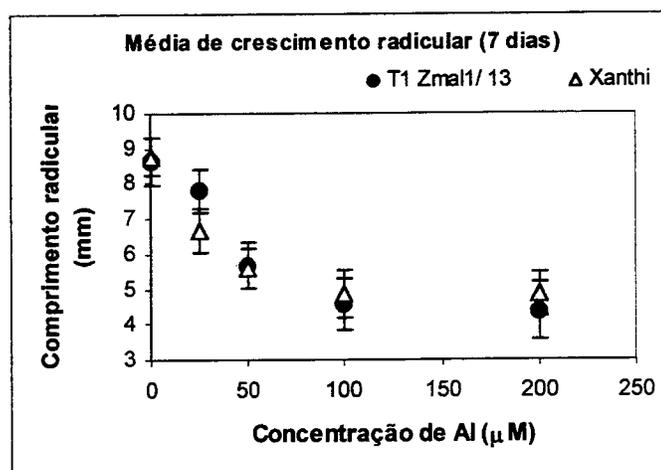


Figura 12 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zmal1/ 13* e *Xanthi* após 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média ± desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 4.

Tabela 5 – Efeito do Al no crescimento radicular de plantas transgênicas (T1 *Zmal1/ 13*) e selvagens (Xanthi). As plântulas foram mantidas por 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) \pm desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
T1 <i>Zmal1/ 13</i>	11,82 \pm 0,57 (d,e)	11,41 \pm 0,70 (a,e)	7,86 \pm 1,48 (f)	6,44 \pm 0,33 (c)	6,67 \pm 0,27 (c)
Xanthi	11,15 \pm 0,79 (a)	8,93 \pm 0,65 (b)	6,65 \pm 0,56 (c)	6,52 \pm 0,53 (c)	6,60 \pm 0,35 (c)

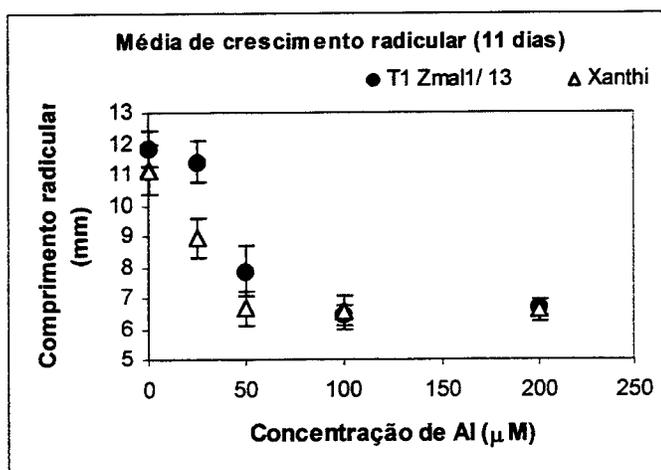


Figura 13 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zmal1/ 13* e Xanthi após 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média \pm desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 5.

De acordo com os resultados é possível observar que os prováveis efeitos da expressão do gene *Zmal1* são detectados após 7 e 11 dias na presença de Al. Aos 7 dias já se observa uma menor redução no crescimento das plantas transgênicas expostas a 25 μ M de Al. Após 11 dias, essa diferença frente ao controle é muito maior, sendo observada também proteção das plantas

expostas a 50 μ M de Al, embora em menor intensidade. As outras plantas T1 *Zmal1* analisadas não apresentaram um melhor desempenho na presença de Al, quando comparadas com a planta controle.

Comparando-se os resultados da fig. 10D, observa-se que apenas os clones 3 e 13 apresentam altos níveis de transcritos na raiz. Portanto, seria de se esperar que a planta 3 também tivesse maior tolerância ao Al, uma vez que apresenta maior acúmulo do mRNA de *Zmal1*. No entanto, existem diversos relatos na literatura mostrando que nem sempre existe correlação entre expressão dos transgenes e alteração de fenótipo. A não tradução dos mRNAs do clone T1 *Zmal1/ 3* pode ser um dos motivos pelo qual esse clone não apresentou uma tolerância maior comparada à planta controle não transformada.

3.4 Análise das plantas transgênicas expressando o gene *Zmgst2*

Os experimentos foram realizados à semelhança daqueles utilizados na detecção do gene *Zmal1*. A amplificação por PCR produziu um fragmento de tamanho esperado (672 pb) na maioria das plantas analisadas (T0 9, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24 e 25) (fig. 14A). As plantas T0 2, 3, 5, 26 e 27, apesar de não terem sido detectados os produtos da amplificação em gel de agarose, apresentaram resultados positivos no *Southern Blot*, dada a maior sensibilidade da técnica (fig 14B). Já as plantas T0 4, 7, 17 e 23 apresentaram resultados negativos tanto no gel, quanto no *Southern Blot*, da mesma forma que o controle negativo, que não apresentou sinal, como era esperado.

Pelos resultados do *Southern Blot*, um segundo fragmento de menor tamanho foi também detectado. Uma possível explicação para a amplificação deste fragmento menor seria um segundo sítio para anelamento do oligonucleotídeo *GST3Pet* no interior da seqüência da *Zmgst2*. De fato, observamos que próximo à posição de 100 pb existe uma região na fita codificadora do gene *Zmgst2*, que apresenta 6 bases idênticas às 6 últimas bases do oligonucleotídeo *GST3Pet*. O fragmento observado, de menor tamanho, estaria de acordo com esta hipótese.

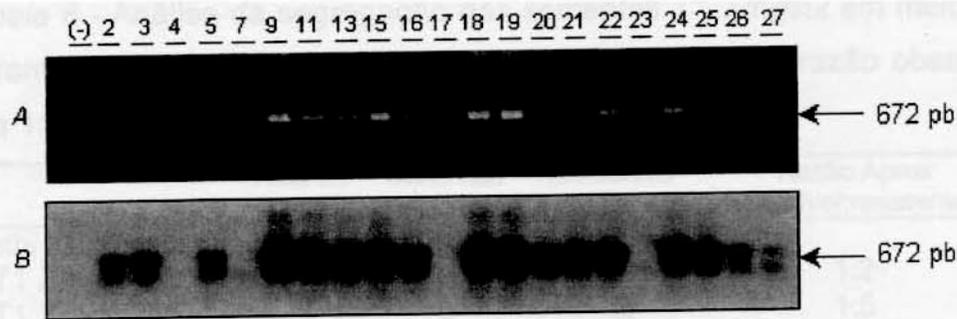


Figura 14 – Identificação dos transformantes por PCR. (-) Controle negativo, números correspondente às plantas T0. (A) Gel de agarose 0,8 % da amplificação utilizando oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a região codificadora do gene *Zmgst2*. (B) *Southern Blot* utilizando a sonda correspondente a região compreendida entre os sítios de restrição *XhoI* marcada com [³²P].

3.4.1 Análise de segregação das sementes das plantas T0 *Zmgst2*

Cinquenta sementes foram semeadas em placas de Petri contendo MS e 25 µg/mL de higromicina e, após cerca de duas semanas, foram quantificadas as plantas resistentes a higromicina (fenótipos normais) e as plantas sensíveis (aspectos amarelados) (tabela 6). Algumas plantas apresentaram problemas durante seu desenvolvimento, o que acarretou na diminuição de 21 plantas analisadas por PCR (fig. 14) para 14 plantas analisadas quanto a segregação fenotípica.

Tabela 6 - Análise da segregação das sementes T1 *Zmgst2* em meio contendo higromicina. A coluna p indica a probabilidade de que a razão observada não seja 1:3. ns: não significativo.

	Total de plantas	Sensíveis	Resistentes	Razão Aprox (sensível:resistente)	p
Xanthi (C. Negativo)	40	40	0		
T1 <i>Zmgst2</i> / 3	36	12	24	1:2	Ns
T1 <i>Zmgst2</i> / 5	36	6	30	1:5	Ns
T1 <i>Zmgst2</i> / 6	36	12	24	1:2	Ns
T1 <i>Zmgst2</i> / 11	42	14	28	1:2	Ns
T1 <i>Zmgst2</i> / 13	45	7	40	1:6	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 16	48	6	42	1:7	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 18	45	6	39	1:6	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 19	42	10	32	1:3	Ns
T1 <i>Zmgst2</i> / 21	46	6	40	1:6	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 22	46	23	23	1:1	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 24	45	6	39	1:6	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 25	48	6	42	1:7	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 26	46	6	40	1:6	p<0,05
T1 <i>Zmgst2</i> / 27	45	7	39	1:6	p<0,05

Podemos observar na tabela 3, a análise de segregação das sementes das plantas T0, e que apenas as plantas T0 *Zmgst2*/ 3, 5, 6, 11 e 19 apresentaram um segregação aproximada de 1:3, indicando a presença de um *locus* de segregação.

3.4.2 Análise da expressão do gene *Zmgst2* nas plantas transformadas

Foram realizadas extrações de RNA total para análise das plantas T1 *Zmgst2* utilizando as técnicas de RT-PCR e *Northern Blot*.

RT-PCR das plantas T1 Zmgst2

A partir de 1 µg de RNA total, foi feita transcrição reversa com o oligonucleotídeo iniciador específico *GST3pet* (5'AGATCTTCACTCCTGTTCC TTGGG CG3') seguida de PCR com o mesmo oligonucleotídeo acrescido do oligonucleotídeo *GST5pet* (5'GAACAGGACCCATGGCTACGCCG3'). Na

primeira amplificação de 35 ciclos, não foi observado nenhum fragmento. Desta forma, foi feita uma reamplificação das amostras anteriores, utilizando o oligonucleotídeo *GST3pet* e um outro mais interno *GSTR3B* (5' CGAACACGCACTCCACCACGAT 3'), que resultaria na amplificação de um fragmento de 370 pb (fig. 15).

Observou-se que todas as plantas T1 *Zmgst2* apresentaram resultado positivo com um fragmento esperado de 370 pb, enquanto que o controle negativo (RNA da linhagem Xanthi não transformada) apresentou resultado negativo.

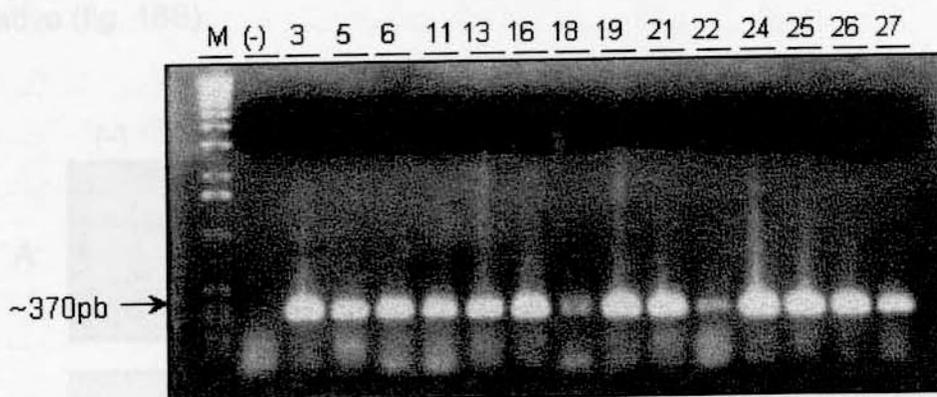


Figura 15 – Identificação dos transformantes que expressam o gene *Zmgst2* por RT-PCR das plantas T1 *Zmgst2*. (-) Controle negativo e os números correspondem às plantas T1. Gel de agarose 0,8 % da reamplificação utilizando oligonucleotídeos *GST3pet* e *GSTR3B*.

O resultado indica que todas as plantas estão expressando o gene *Zmgst2*. Porém, a necessidade de duas amplificações indica que os níveis de expressão podem estar reduzidos.

A análise de segregação com todas as plantas apresentando indivíduos resistentes indicam que o gene está integrado no genoma.

Northern Blot das plantas T1 *Zmgst2*

Aproximadamente 15 µg de RNA total de folha de todas as plantas T1 *Zmgst2* foram submetidos a uma corrida eletroforética (fig. 16A) e transferidas para membrana de náilon. A membrana foi hibridada com a sonda da região codificadora do gene *Zmgst2*. Observou-se que as plantas T1 *Zmgst2*/ 3, 18, 19, 21 e 24 apresentaram resultado positivo pela presença de um fragmento de tamanho esperado. Já as plantas T1 *Zmgst2*/ 5, 6, 11, 12, 13, 16, 22, 25, 26 e 27, além do controle negativo (RNA da planta Xanthi), apresentaram resultado negativo (fig. 16B).

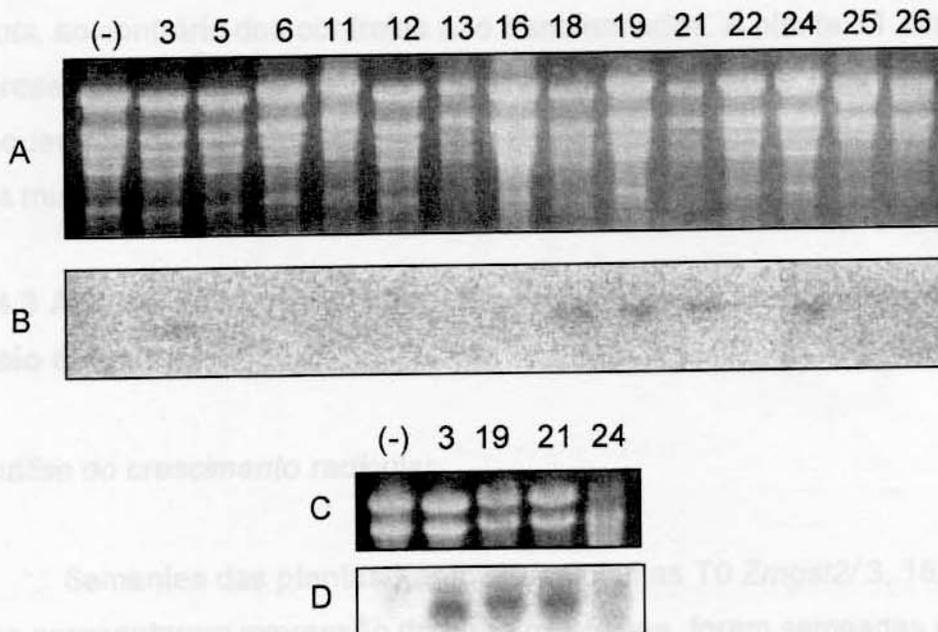


Figura 16 – Identificação dos transformantes que expressam o gene *Zmgst2* por Northern Blot das plantas T1 *Zmgst2*. Números correspondem às plantas T1 e (-) Controle negativo. (A) Gel de agarose 1 % contendo formaldeído dos RNAs de folha das plantas T1 *Zmgst2*. (B) Auto-radiografia da membrana contendo RNA de folha das plantas T1 *Zmgst2*, hibridada com sonda da região codificadora do gene *Zmgst2* marcada com [³²P]. (C) Gel de agarose 1 % contendo formaldeído dos RNAs das raízes das plantas T1 *Zmgst2*. (D) Auto-radiografia da membrana contendo RNA de raiz das

plantas T1 *Zmgst2*, hibridada com sonda da região codificadora do gene *Zmgst2* marcada com [³²P].

Assim, todas as plantas T1 *Zmgst2* apresentaram resultado positivo no RT-PCR e apenas as plantas T1 *Zmgst2*/ 3, 18, 19, 21 e 24 apresentaram resultado positivo também no *Northern Blot*, sugerindo que essas plantas provavelmente apresentam maior nível de transcritos.

Para certificar-se de que a expressão do gene também ocorre na raiz, foi realizado um *Northern Blot* utilizando RNA total de raiz das plantas que apresentaram resultado positivo no *Northern Blot* da figura 16B. As plantas T1 *Zmgst2*/ 3, 19 e 21 apresentaram resultado positivo em ambos os *Northern Blots*, ao contrário dos controles não transformados. A planta T1 *Zmgst2*/24 não apresentou expressão na raiz, o que deve ser causa de uma expressão muito pequena, já que mesmo no *Northern Blot* de folha a expressão do gene também era muito baixa.

3.4.3 Análise da tolerância ao Al por diferença de crescimento radicular em meio de cultura

Análise do crescimento radicular

Sementes das plantas Xanthi e das plantas T0 *Zmgst2*/ 3, 18, 19, 21 e 24, que apresentaram expressão do gene nas folhas, foram semeadas em placas de Petri com meio MS RG, com 25 µg/mL de higromicina para as plantas T0 *Zmgst2*, e crescidas verticalmente. Dez plantas de todos os clones, com aproximadamente 3 cm, foram transplantadas para meios MS RG com diferentes concentrações de Al (0, 25, 50, 100 e 200 µM), sendo feitas as medições do crescimento radicular após 4, 7 e 11 dias. Dentre as plantas avaliadas em experimentos repetidos duas vezes, apenas as plantas T1 *Zmgst2*/ 19 apresentaram resultados de interesse.

Tabela 7 – Efeito do Al no crescimento radicular das plantas transgênicas T1 *Zmgst2/ 19* e selvagens (*Xanthi*). As plântulas foram mantidas por 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) \pm desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
T1 <i>Zmgst2/ 19</i>	6,64 \pm 0,62 (a)	6,21 \pm 0,37 (e)	6,13 \pm 0,54 (e)	5,24 \pm 0,50 (b)	4,41 \pm 0,31 (c)
<i>Xanthi</i>	6,66 \pm 0,64 (a)	5,21 \pm 0,50 (b)	4,46 \pm 0,54 (c)	4,00 \pm 0,50 (d)	4,04 \pm 0,37 (d)

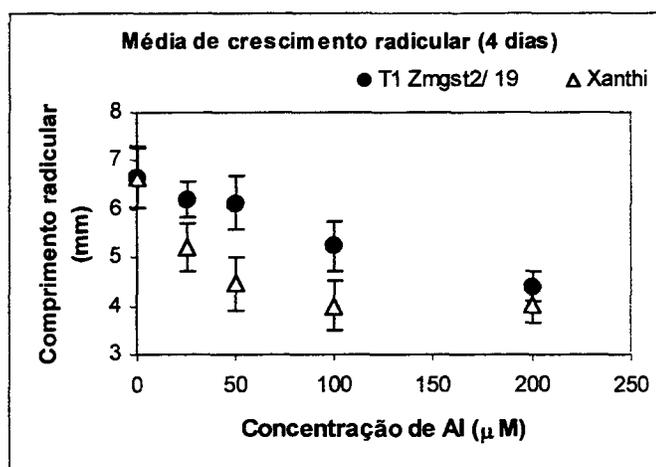


Figura 17 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zmgst2/ 19* e *Xanthi* após 4 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média \pm desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 7.

Tabela 8 – Efeito do Al no crescimento radicular das plantas transgênicas (T1 *Zmgst2/ 19*) e selvagens (*Xanthi*). As plântulas foram mantidas por 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) \pm desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M	200 μ M
T1 <i>Zmgst2/ 19</i>	8,44 \pm 0,69 (ae)	8,06 \pm 0,63 (e)	7,29 \pm 0,66 (f)	6,75 \pm 0,73 (b)	5,61 \pm 0,80 (c)
<i>Xanthi</i>	8,78 \pm 0,54 (a)	6,69 \pm 0,62 (b)	5,59 \pm 0,56 (c)	4,86 \pm 0,68 (d)	4,88 \pm 0,61 (d)

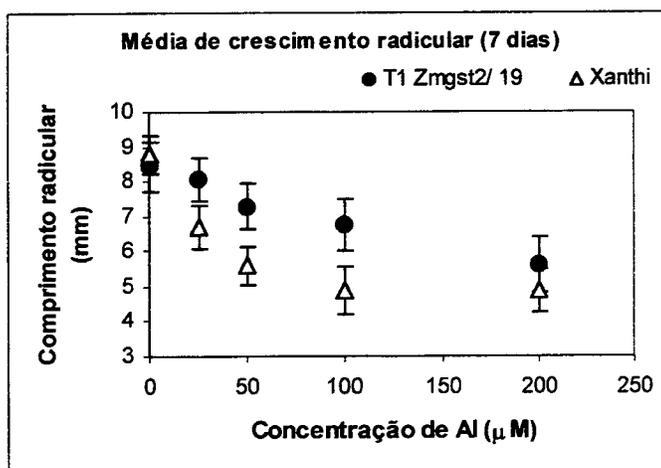


Figura 18 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zmgst2/ 19* e *Xanthi* após 7 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média \pm desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 8.

Tabela 9 – Efeito do Al no crescimento radicular das plantas transgênicas (T1 *Zmgst2/ 19*) e selvagens (*Xanthi*). As plântulas foram mantidas por 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al, após o que foi calculado o crescimento radicular. Os valores representam as médias (mm) \pm desvio padrão de 20 plantas de 2 experimentos distintos.

	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM	200 μM
T1 <i>Zmgst2/ 19</i>	10,63 \pm 0,50 (d)	9,31 \pm 0,65 (b)	9,22 \pm 0,56 (b)	8,06 \pm 0,54 (e)	7,20 \pm 0,59 (f)
<i>Xanthi</i>	11,15 \pm 0,79 (a)	8,93 \pm 0,65 (b)	6,65 \pm 0,56 (c)	6,52 \pm 0,53 (c)	6,60 \pm 0,35 (c)

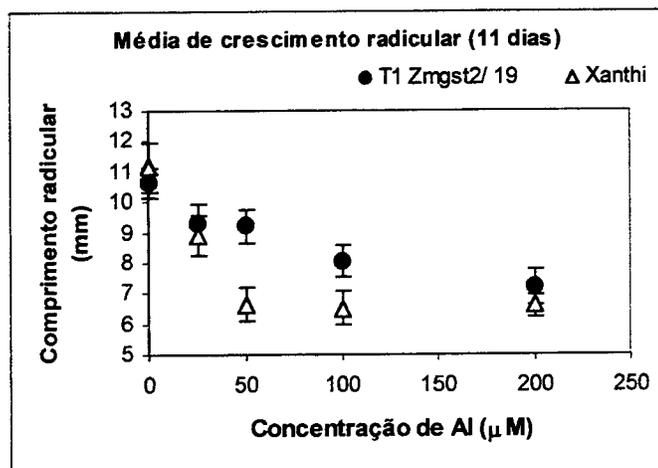


Figura 19 – Crescimento radicular das plantas T1 *Zmgst2/ 19* e *Xanthi* após 11 dias em meio de cultura contendo diferentes concentrações de Al. Os pontos representam a média \pm desvio padrão e as letras entre parênteses referem-se ao resultado da análise estatística com o teste de Duncan ($p < 0,05$) dos dados apresentados na tabela 9.

De acordo com os resultados é possível observar que a proteção conferida provavelmente pelo gene *Zmgst2* nas plantas T1 *Zmgst2/ 19* é maior nos tempos iniciais do estresse por Al, distintamente do observado das plantas T1 *Zmal1/ 13*. Aos 4 dias a proteção é observada em todas as concentrações analisadas, sendo menor na concentração de 200 μM de Al. Aos 7 dias o padrão

praticamente não foi alterado, enquanto que após 11 dias existe a tendência de as diferenças com o controle serem menores. As outras quatro plantas analisadas não apresentaram um melhor desempenho na presença de Al, ainda que os clones 19 e 21 apresentassem níveis similares de transcritos (fig. 16D). Tais resultados, à semelhança do que ocorreu com as plantas transformadas com o gene *Zma1*, podem ocorrer durante a análise de plantas transgênicas, cuja discussão foi realizada anteriormente.

3.5 Análise das plantas transgênicas expressando o gene *OMT134*

A análise em gel de agarose permitiu a detecção de um produto de amplificação de aproximadamente 910 pb, representando a região codificadora do gene *OMT134* nas plantas T0 1, 4, 6, 8 (fig. 20A). Tais resultados foram confirmados pelo *Southern Blot* (fig. 20B), onde as mesmas plantas T0 1, 4, 6, 8 apresentaram a banda de tamanho esperado na auto-radiografia.

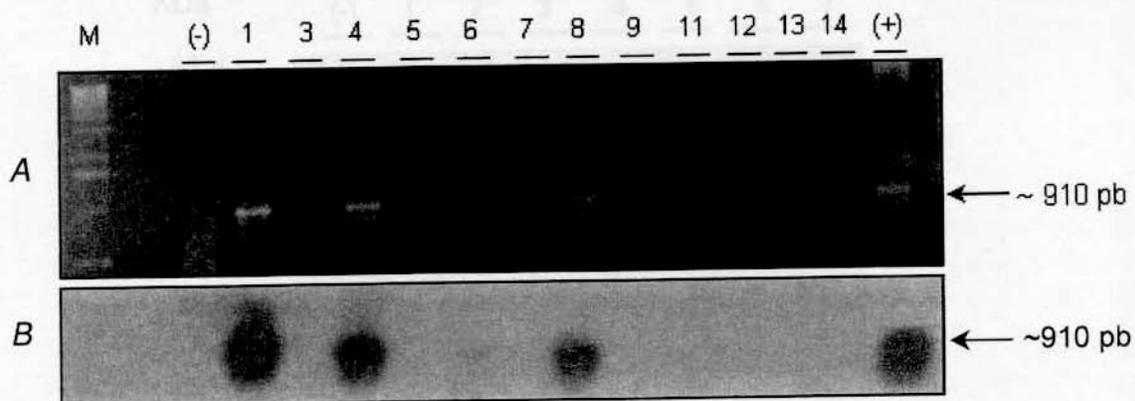


Figura 20 – Identificação dos transformantes por PCR das plantas T0 *OMT134*. (A) Gel de agarose 0,8 % da amplificação utilizando oligonucleotídeos que flanqueiam a região codificadora do gene *OMT134*. (B) *Southern Blot* utilizando uma sonda correspondente a região codificadora do gene *OMT134* marcada com $[^{32}\text{P}]$. (-): Controle negativo (planta não transformada); os números correspondem às plantas T0; (+) Controle positivo (região codificadora do gene *OMT134*).

3.5.1 Western Blot das plantas T0 OMT134

A disponibilidade de anticorpo contra a proteína OMT (gentilmente cedido pelo Dr. M. Taniguchi) permitiu avaliar diretamente os níveis da proteína nas plantas transgênicas por meio da técnica de *Western Blot*.

Os resultados do *Western Blot* indicaram que a planta T0 OMT134/ 4 apresentou expressão da proteína do translocador de malato de aproximadamente 33KDa, como esperado (fig. 21).

O resultado positivo no *Western Blot* do clone T0 OMT134/ 4 associado à observação de diferenças fenotípicas (maior quantidades de ramos) desse clone em relação ao controle não transformado, aparentemente mostrava resultados interessantes, mas os resultados futuros não corresponderam às expectativas, já que a geração T1 desse clone não apresentou a expressão do gene OMT134, e muito menos a produção da proteína.

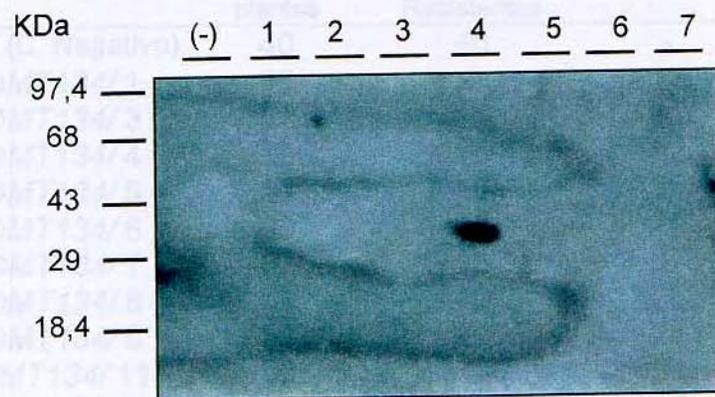


Figura 21 – Identificação dos transformantes por *Western Blot* das plantas T0 OMT134. Imagem obtida após incubação da membrana de náilon com anticorpo contra o translocador de malato e detectada com anticorpo IgG de rato, conjugada com fosfatase alcalina. (-): Controle negativo; os números correspondem às plantas T0.

As plantas T0 OMT134/ 1, 4, 6 e 8, apesar de apresentarem o gene integrado no genoma das plantas, não apresentaram níveis detectáveis da

proteína por *Western Blot*, indicando possíveis problemas na tradução do transcrito *OMT134*.

3.5.2 Análise de segregação das sementes das plantas T0 *OMT134*

Cerca de 50 sementes foram semeadas em placas contendo MS e 25 µg/mL de higromicina e, após cerca de duas semanas, foram identificadas as plantas que eram resistentes a higromicina por apresentarem fenótipos normais, e as plantas sensíveis por se apresentarem amarelas (tabela 10).

Tabela 10 - Análise de segregação das sementes T1 *OMT134* em meio contendo higromicina. A coluna p indica a probabilidade de que a razão observada não seja 1:3. ns: não significativo.

	Total de plantas	Não Resistentes	Resistentes	Razão aprox.	P
Xanthi (C. Negativo)	40	40	-		
T1 <i>OMT134/1</i>	40	8	32	1:4	Ns
T1 <i>OMT134/3</i>	51	16	35	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/4</i>	50	18	32	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/5</i>	51	16	35	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/6</i>	43	14	29	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/7</i>	52	15	37	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/8</i>	43	10	33	1:3	Ns
T1 <i>OMT134/9</i>	36	12	24	1:2	Ns
T1 <i>OMT134/11</i>	40	6	34	1:5	Ns
T1 <i>OMT134/12</i>	43	6	37	1:6	Ns
T1 <i>OMT134/13</i>	36	18	18	1:1	p<0,05
T1 <i>OMT134/14</i>	57	5	52	1:10	p<0,05

Pelos resultados apresentados na tabela 10 e analisando-se a segregação das sementes das plantas T0, a maioria das plantas apresentou uma segregação aproximada de 1:3, sugerindo a presença de apenas um único *locus* no genoma contendo o gene *OMT134*. Apenas as plantas T0 *OMT134/13* e 14, apresentaram desvios quanto a segregação esperada.

3.5.3 Análise da expressão do gene *OMT134* nas plantas transformadas

RT-PCR e Northern Blot das plantas T1 OMT134

Todas as plantas T1 *OMT134* foram submetidas à reação de RT-PCR, partindo de aproximadamente 1 µg de RNA total e utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos que flanqueiam a região codificadora do gene. A primeira amplificação resultaria em um fragmento de 910 pb, mas não foi possível observar qualquer fragmento.

Para comparar com o resultado do RT-PCR, também foram feitos vários *Northern Blots*, não sendo detectado sinal algum. Tal resultado pode ter ocorrido devido ao silenciamento do gene, por um bloqueio na sua transcrição. Estudos indicam que diversas causas como números de cópias inseridas, nível de transcrição, metilação do genoma da planta e local de inserção podem contribuir para o bloqueio da transcrição do gene (Fargard *et al.*, 2000).

3.6 Sumário dos resultados

Os resultados obtidos estão sumarizados nas figuras 22 e 23, nas quais são mostrados os crescimentos radiculares de plântulas da geração T1 derivadas de um transformante primário (T0) para cada um dos genes *Zmal1* (T1 *Zmal1/* 13) e *Zmgst2* (T1 *Zmgst2/* 19). Os períodos de crescimento das plântulas em meio contendo AI apresentados foram os de 7 e 11 dias, pelo fato de terem permitido a detecção de diferenças significativas dos efeitos dos transgenes.

As plântulas T1 *Zmgst2/* 19 apresentaram maior tolerância nos tempos iniciais do estresse por AI. Aos 4 dias a proteção foi observada em todas as concentrações analisadas, sendo menor na concentração de 200 µM de AI. Aos 7 dias o padrão praticamente não foi alterado, enquanto que após 11 dias existe uma tendência de que as diferenças com o controle sejam menores.

Ezaki *et al.* (2000) obtiveram plantas transgênicas de *arabidopsis* superexpressando o gene GST da mesma espécie, onde observaram que as plântulas controle de *arabidopsis* em 100 μ M de Al tiveram uma redução de 60 % no crescimento radicular, enquanto que nas plantas transgênicas a redução foi de 40 %. No caso do gene *Zmgst2*, esses valores foram de 45 % e 20 %, respectivamente, após um período de 7 dias (fig. 23). Embora existam diversas diferenças entre os ensaios, os resultados desses autores utilizando *arabidopsis* crescida por 2 dias na presença de 100 μ M de Al, foram muito similares aos obtidos no presente estudo, onde o padrão de tolerância da planta T1 *Zmgst2/19* foi também em torno de 20 % de inibição do crescimento radicular, em relação às plantas crescidas na ausência de Al. A planta selvagem Xanthi apresentou cerca de 45 % de inibição, enquanto que a linhagem selvagem Ler-0 utilizada por Ezaki *et al.* (2000) apresentou cerca de 32 % de inibição.

Após 7 dias, as plântulas T1 *Zma11/13* apresentaram maior tolerância que a linhagem selvagem frente a 25 μ M de Al. No entanto, em concentrações maiores, tal efeito não foi observado. Após 11 dias, essa diferença frente ao controle foi muito maior, sendo observada também proteção das plantas expostas a 50 μ M de Al, embora em menor intensidade. O gene *Zma11* codifica uma proteína rica em glicina que faz parte da mucilagem (Maron *et al.*, manuscrito em preparação). Recentemente, Miyasaka e Hawes (2001) mostraram que existe uma estreita correlação entre a produção de mucilagem e a tolerância ao Al em feijão, sugerindo que a mucilagem atue ligando-se ao Al. Uma segunda hipótese seria a contribuição para uma menor dispersão de ácidos orgânicos, como citrato e malato, liberados pela raiz na presença de Al. Assim, a expressão do gene *Zma11* em tabaco poderia alterar a composição da mucilagem, aumentando sua capacidade protetora.

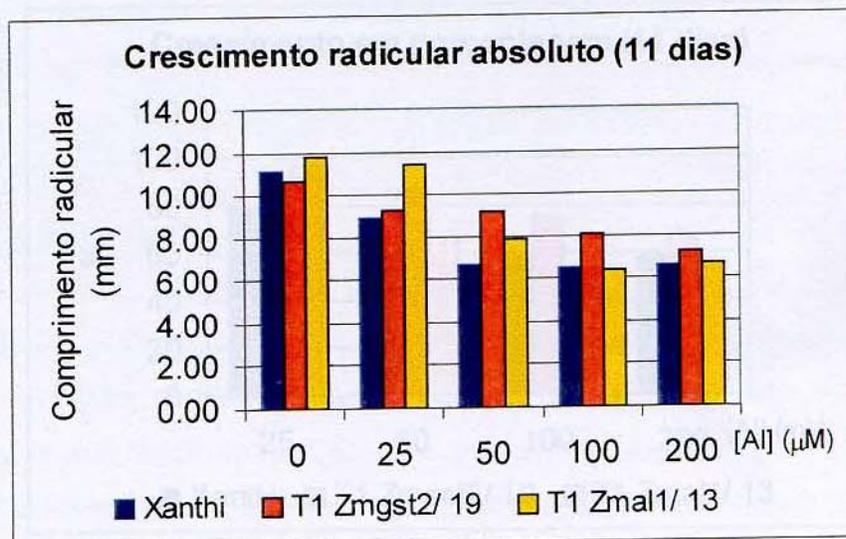
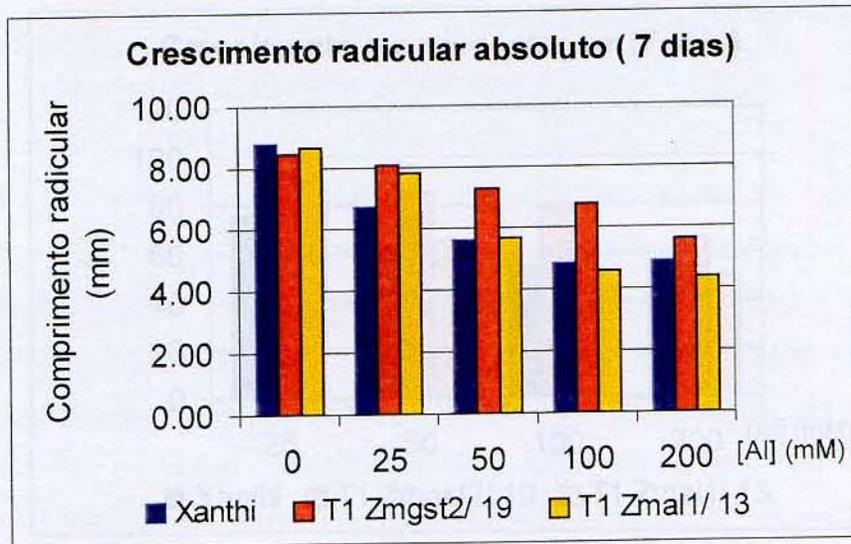


Figura 22 – Efeito dos transgenes no crescimento radicular das plantas Xanthi (controle negativo), T1 Zmgst2/ 19 e T1 Zmal1/ 13 em diferentes concentrações de Al, após 7 e 11 dias. O crescimento radicular de cada linhagem na ausência de Al foi considerado 100%.

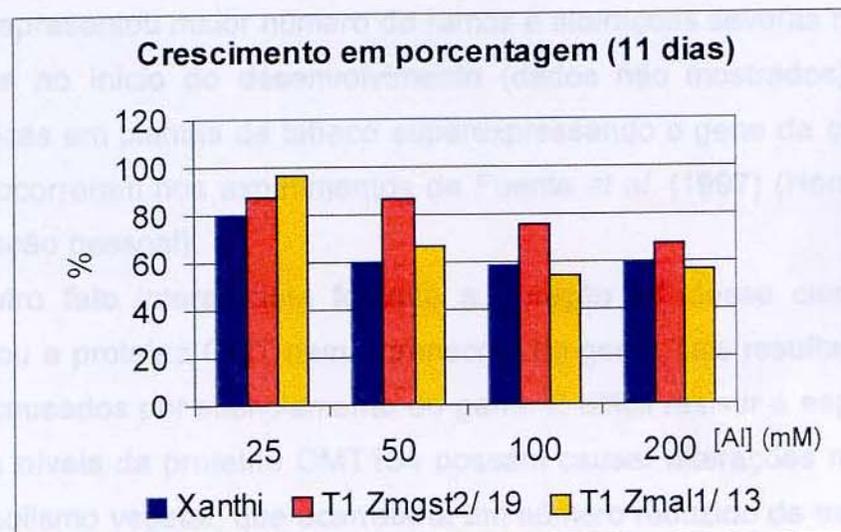
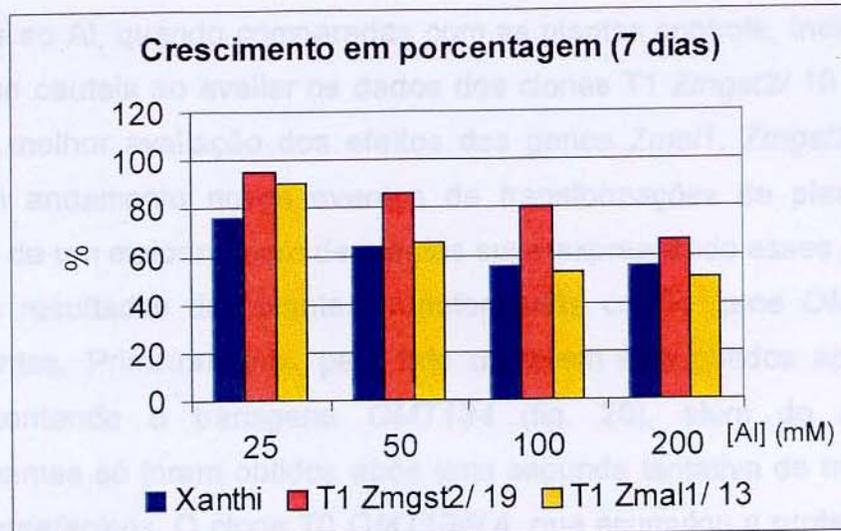


Figura 23 – Efeito dos transgenes no crescimento radicular das plantas Xanthi (controle negativo), T1 *Zmgst2/19* e T1 *Zmal1/13* em diferentes concentrações de Al, após 7 e 11 dias. O crescimento radicular de cada linhagem na ausência de Al foi considerado como 100%.

Os resultados com os clones T1 *Zmgst2/19* e T1 *Zmal1/13* foram muito promissores quanto ao uso desses genes para o aumento da tolerância ao estresse por Al. No entanto, não foi possível obter um número maior de transformantes com expressão elevada dos transgenes nas raízes. Grande parte das plantas transgênicas obtidas não apresentaram diferença significativa na

tolerância ao AI, quando comparadas com as plantas controle, indicando que é necessário cautela ao avaliar os dados dos clones T1 *Zmgst2*/ 19 e T1 *Zmal1*/ 13. Para melhor avaliação dos efeitos dos genes *Zmal1*, *Zmgst2* e *OMT134* estão em andamento novos eventos de transformações de plantas, para a obtenção de um maior número de plantas superexpressando esses genes.

Os resultados das plantas transformadas com o gene *OMT134* foram interessantes. Primeiramente, pelo fato de terem sido obtidos apenas quatro clones contendo o transgene *OMT134* (fig. 20), além do que, os 12 transformantes só foram obtidos após uma segunda tentativa de transformação com *A. tumefaciens*. O clone T0 *OMT134*/ 4, que acumulou a proteína OMT134 (fig. 21), apresentou maior número de ramos e alterações severas na morfologia em folhas no início do desenvolvimento (dados não mostrados). Alterações morfológicas em plantas de tabaco superexpressando o gene da citrato sintase também ocorreram nos experimentos de Fuente *et al.* (1997) (Herrera- Estrela, comunicação pessoal).

Outro fato interessante foi que a geração T1 desse clone não mais apresentou a proteína OMT nem o transcrito do gene. Tais resultados parecem ter sido causados por silenciamento do gene. É difícil resistir à especulação de que altos níveis da proteína OMT134 possam causar alterações muito nocivas no metabolismo vegetal, que acarretaria um número reduzido de transformantes e ativaria o silenciamento do transgene.

Uma alternativa para contornar este problema seria o emprego de promotores específicos que ativam a expressão do transgene somente sob condições desejadas, como é o caso do promotor sintético cuja expressão ocorre apenas na presença de dexametasona (McNellis *et al.*, 1998). No momento, estamos aguardando o envio de uma construção com este promotor, requisitado ao Dr. NH. Chua (Rockefeller University, EUA).

4- CONCLUSÕES

- Foram obtidas plantas transgênicas com os genes *Zmal1*, *Zmgst2* e *OMT134*.
- As plântulas T1 *Zmgst2/ 19* apresentaram maior tolerância frente a 25, 50 e 100 μM de Al em relação à planta selvagem Xanthi. Na concentração de 200 μM de Al, os efeitos do transgene foram perceptíveis, porém não significativos.
- As plântulas T1 *Zmal1/ 13* apresentaram maior tolerância que a linhagem selvagem frente a 25 μM de Al, após 7 dias de experimento. Após 11 dias essa diferença frente ao controle é muito maior, sendo observada também proteção das plantas expostas a 50 μM de Al, embora em menor intensidade.
- Não se observou uma correlação evidente entre o nível de expressão dos genes e a tolerância ao Al, tanto nas plantas T1 *Zmgst2/ 19* quanto T1 *Zmal1/ 13*, o que pode ter sido reflexo do número reduzido de transformantes.
- Apesar de termos observado a produção da proteína na planta T0 *OMT134/ 4*, não foi possível detectar a presença de mRNAs e da proteína nas plantas T1 *OMT134/ 4*, podendo ter sido consequência de um silenciamento do gene.
- Os resultados obtidos não são conclusivos quanto aos efeitos da superexpressão dos genes *Zmgst2* e *Zmal1* na tolerância ao Al, devido ao número reduzido de plantas transgênicas obtidas, expressando os transgenes e apresentando maior tolerância frente ao Al.

5- Referências Bibliográficas

- Ann, G, Ebert P, Mitra A, Ha S (1988).** Binary vectors. In: Plant Molecular Biology Manual S.B. Gelvin, R.A. Schilpe- Kluwer Academic Publishers, Holand, pp1-19
- Alva AK, Edwards DG, Asher CJ e Blamey FP (1986).** Relationships between root length of soybean and calculated activities of aluminum monomers in nutrient solution. *Sol Sci Soc Am J* 50:959-962
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA e Struhl K (1992).** Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition.
- Basu U, Basu A, Taylor GJ (1994).** Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum resistant and aluminum sensitive cultivars of *Triticum aestivum* in response to aluminum stress. *Plant Physiol* 106: 151-158
- Berger NA (1991).** Oxidant induced cytotoxicity. A challenge for metabolic modulation. *Am J Resp Cell Biol* 106: 151-158
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AOM (1977).** Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH. Ubiquinone reductase and ubiquinol cytochrome C reductase from beef heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180: 248-257
- Cakmak I, Horst WJ (1991).** Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root- tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plantarum* 83: 463-468
- Degenhardt J, Larsen PB, Howell SH, Kochian LV (1998).** Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol* 117: 19-27
- Deleers M, Srevais JP e Wulfert E (1986).** Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. *Biochim Biophys Acta* 855: 271- 276
- Delhaize E, Ryan PR e Randall PJ (1993).** Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-estimated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol* 103: 695-702
- Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y (2000).** Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol* 122(3): 657-665
- Fargard M, Vaucheret H (2000).** (Trans) Gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* 51: 167-194
- Foy CD (1983).** The physiology of plant adaptation to mineral stress. *Iowa State J Res*, 57: 355-392
- Foy CD (1984).** Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In F. Adams eds, *Soil Acidity and Liming*, Madison Ann Soc Agron, pp 57-97
- Gille G, Sigler K (1995).** Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiology* 40(2): 131-152
- Haug A, Shi B e Vitorello V (1994).** Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch Toxicol* 68: 1-6

- Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT (1988).** Leaf disc transformation. *A5*: 1-9
- Ishii H, Kurose I, Kato S (1997).** Pathogenesis of alcoholic liver disease with particular emphasis on oxidative stress. *J. Gastroent Hepat* 12(9-10): 272-282
- Jones DL, Kochian LV (1997).** Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in aluminum cytotoxicity. *FEBS Letters*, 400: 51-57
- Jorge RA, Arruda P (1997).** Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an Al-tolerant tropical maize variety. *Phytochem* 45:675-681
- Jorge RA, Menossi M, Arruda P (2001).** Probing the role of calmodulin in Aluminum toxicity in maize phytochemistry. (no prelo)
- Kaneko M, Panaga Y, Paolillo G, Majumer S, Ou C, Dhalla NS (1990).** Inhibition of cardiac phosphatidylethanolamine N-methylation by oxygen free- radicals. *Biochem Biophys Acta* 1021: 33-38
- Keltjens WG (1997).** Plant adaptation and tolerance to acid soils; its possible Al avoidance. A review. *Plant interactions at low pH*, 109-117
- Kinraide TB (1991).** Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134:167-178
- Kochian LV (1995).** Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 237-260
- Kristian T, Siesjo BK (1998).** Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29(3): 705-718
- La Fuente JM, Ramirez- Rodríguez V, Cabrera- Ponce JL, Herrera- Estrella L (1997).** Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568
- Lamb C, Dixon RA (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Reviews Plant Physiol and Plant Mol Biol* 48: 251-275
- Larsen PB, Degenhardt J, Tai CY, Stenzler LM, Howell H, Kochian LV (1998).** Aluminum-resistant *arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol* 117(1): 9-18
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990).** *Methods in Enzimology* 186: 464-478
- Longemann J, Schell J and Willmitzer L (1987).** Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Ann Biochem* 163:16-20
- MacDiarmid CW, Gardner RC (1998).** Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J Biol Chem* 273(3): 1727-1732
- Mannervik B, Danielson UH (1988).** Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 23: 283- 337
- Marrs KA (1996).** The function and regulation of glutathione S- transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 47: 127-158

- Martin RB (1992).** In: Aluminum in Biology e Medicine. John Wiley, New York, pp5-25
- McNellis TW, Mudgett MB, Li K, Aoyama T, Horvath D, Chua NH, Staskawicz BJ (1998).** Glucocorticoid inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant Journal* 14(2): 247-257
- Myasaka SC, Kochian LV, Shaff JE, Foy CD. (1989).** Proc Workshop on Adaptation of Plants to Soil Stresses; University of Nebraska, Lincon; Intsormil Publication 94(2): 209-233
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, Foy CD (1991).** Mechanisms of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol*, 96: 737-743
- Miyasaka SC, Hawes MC (2001).** Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. *Plant Physiol* 125(4): 1978-1987
- Moon DH, Ottoboni LMM, Souza AP, Sibov ST, Gaspar M, Arruda P (1997).** Somaclonal variation induced aluminum sensitive mutant from an aluminum inbred maize tolerant line. *Plant Cell Rep*, 16:686-691
- Ownby JD, Popham HR (1989).** Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by Aluminum. *J Plant Physiol*, 135: 588- 591
- Pan A, Yang M, Tie F, Li L, Chen Z, Ru B (1994).** Expression of mouse metallothionein I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. 24: 341-351
- Parker DR, Kinraide TB, Zelazny LW (1988).** Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy aluminum solutions. *Sol Sci Soc Am J* 52: 438-444
- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV (1995).** Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). *Planta* 196:788-795
- Pickett CB, Lu AYH (1989).** Glutathione S transferase: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 58: 743-764
- Rao IM, Zeigler RS, Vera R, Sarkarung S (1993).** Selection and breeding for acid soil tolerance in crops. *Bioscience* 43:454-465
- Rengel Z (1992).** Role of calcium in aluminum toxicity. *New Phytol* 121:499-513
- Richards KD, Schott EJ, Sharma YK, Davis KR, Gardner RC (1998).** Aluminum induces oxidative stress genes in *arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116(1): 409-418
- Richter DD, Markewitz D (1995).** How deep is soil, the zone of the earths crust that is biologically-active, is much deeper than has been thought by many ecologists. *Bioscience* 45: 600-609
- Richter C, Kass GEN (1991).** Oxidative stress in mitochondria. It's relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell-death, proliferation, and differentiation. *Chem Biol Interact* 77: 1-23
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ (1995).** Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat. *Aust J Plant Physiol* 22:531-536
- Ryter SW, Tyrrell RM (1998).** Singlet molecular oxygen (O¹₍₂₎): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Rad. Biol. Med.* 24(9): 1520-1534

Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Press. EUA

Sandermann H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biol. Sci. 17: 82- 84

Santana DP, Sans LMA (1999). The distribution and nature of soils with low phosphorus in the brazilian savannas. Workshop on improving phosphorus acquisition efficiency in marginal soils, Outubro 17-22, 1999, Sete Lagoas, Brasil

Somers DJ, Gustafson JP (1995). The expression of aluminum stress induced polypeptides in a population segregating for aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum L.*). Genome 38: 1213-1220

Spragg RG, Hinshaw DB, Hyslop PA, Schrauffstätter IU, Cochrane CG (1985). Alterations in adenosine- triphosphate and energy charged in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury. J Clin Invest 76(4): 1471-1476 1985

Taniguchi M, Sugyama T (1996). Isolation, characterization and expression of cDNA clones encoding a mitochondrial malate translocator from *Panicum miliaceum L.* Plant Mol Biol 30:51-64

Taylor GJ (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity. In H Sigel, A Sigel eds, Metal Ions in Biological Systems, Vol 24. Marcel Dekker, New York, pp 123-163

Vercellotti GM, Severson SP, Duane P, Modow CF (1991). Hydrogen-peroxide alters signal transduction in human endothelial cells. J Lab Clin Med 117(1): 15-24

Verstraeten SV, Golub MS, Keen CL, Oteiza PI (1997). Myelin is a preferential target of aluminum-mediated oxidative damage. Arch Biochem and Biophys 344(2): 289-294

Yamada Y, Yokota M, Furumichi T, Furui H, Yamauchi K, Saito H (1990). Cardiovas Res 24: 993-997

Yermiyahu U, Brauer DK, Kinraide TB (1997). Sorption of aluminum to plasma membrane vesicles isolated from roots of Scout 66 and Atlas 66 cultivars of wheat. Plant Physiol 115(3): 1119-1125

Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H (1998). Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long term exposure to aluminum stress. Physiol Plantarum 103: 209-214