

Julio de Andrade Garighan¹, Carolina Werner Ribeiro², Márcia Márgis-Pinheiro¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
²PPGBMC, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. Introdução

Ascorbato peroxidase (APx) é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em água, utilizando o ascorbato como doador de elétrons. O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) produzido constantemente pelo metabolismo aeróbico. Essa produção é aumentada em situações de estresse biótico ou abiótico, e em grandes quantidades pode causar diversos danos celulares. Em arroz, a APx é codificada por oito genes, cujas isoformas são caracterizadas por sua localização subcelular: citosólica, peroxissomal, mitocondrial ou cloroplastidial. A caracterização dos genes codificadores de APx vem sendo feita e o estudo de promotores é uma ferramenta de grande importância que possibilita analisar o padrão de expressão de genes em plantas. **Promotor** é uma região reguladora que está a uma curta distância da extremidade 5' de um gene e atua como local de ligação da RNA polimerase. O objetivo deste trabalho é estudar o padrão de expressão dos genes das isoformas *OsAPx1* (citosólica), *OsAPx3* e *OsAPx4* (peroxissomais) de ascorbato peroxidase através da análise dos seus promotores.

2. Materiais e Métodos

Construção dos plasmídeos: para a construção dos vetores foram isoladas sequências de aproximadamente 2kb anteriores ao sítio de iniciação da tradução de cada um dos genes. Esses fragmentos foram clonados no vetor de entrada pENTR e recombinados no vetor de destino pHGWFS7 (figura 1 e 2). As construções foram denominadas de pPROM1, pPROM3 e pPROM4, correspondentes aos promotores dos genes *OsAPx1*, *OsAPx3* e *OsAPx4*, respectivamente.

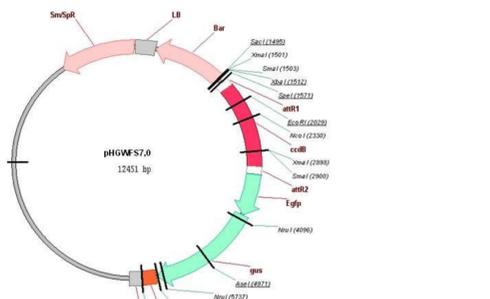


Figura 1. Vetor pHGWFS7 para transformação de plantas para estudo de promotores.

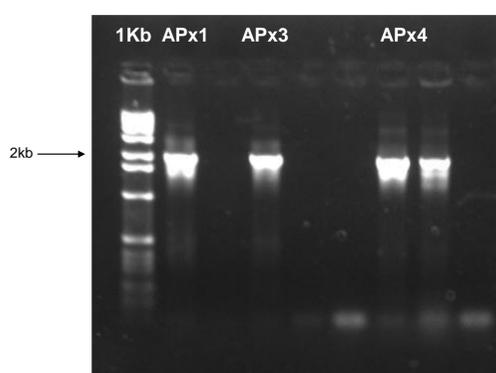


Figura 2. Gel de agarose 1% confirmando a clonagem das regiões promotoras dos genes *OsAPx1*, *OsAPx3* e *OsAPx4*.

Transformação vegetal: a transformação de calos de arroz foi feita via *Agrobacterium tumefaciens*. Os calos transformados foram regenerados e cultivados em meio de seleção com higromicina.

Ensaio histoquímico com GUS: para visualização do padrão de expressão dos promotores, calos transformados foram incubados com o substrato X-Gluc e incubados a 37°C por 24h.

3. Resultados e Discussão

OsAPx4

Para confirmar a funcionalidade do promotor do gene *OsAPx4*, foi realizado um ensaio histoquímico para detectar a expressão do gene GUS.

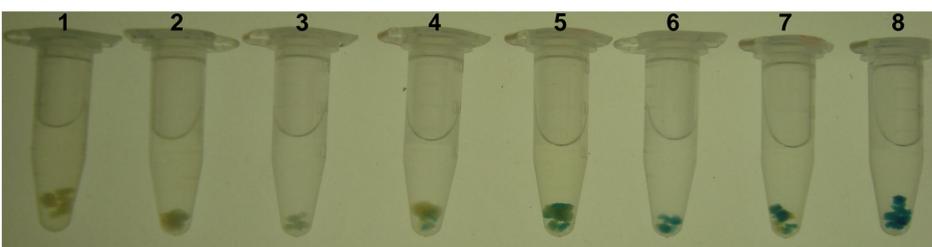


Figura 3. Confirmação da expressão do gene *gus* regulado pelo promotor de *OsAPx4*. Tubo 1 – calo não-transformado; tubos 2 a 8 – calos transformados, com diferentes níveis de expressão

A confirmação da transgenia das plantas transformadas com a construção pPROM4 foi verificada por PCR (figura 4).

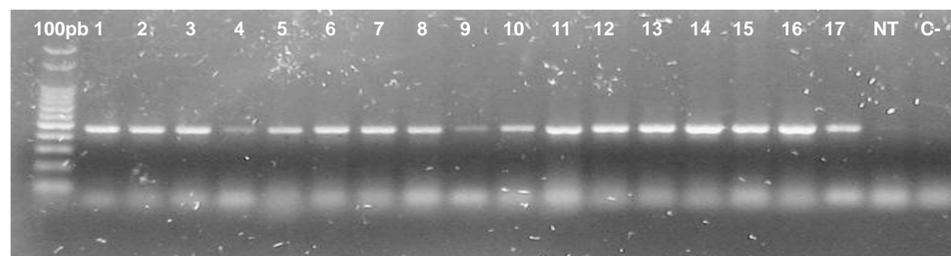


Figura 4. Gel de agarose 1% confirmando a transgenia nas plantas transformadas com a construção pPROM4. Produtos amplificados correspondentes ao gene *hpt*, que confere resistência à higromicina. As canaletas 1 a 17 correspondem às plantas transformadas, NT – planta não transformada e C- - controle negativo.

As sete linhagens de plantas superexpressando o promotor da isoforma *OsAPx4* foram transferidas para vasos e aclimatadas em casa de vegetação (figura 5).



Figura 5. Plantas transformadas com a construção pPROM4 (esquerda) e plantas não-transformadas (direita).

OsAPx1 e *OsAPx3*

Calos de arroz foram transformados com as construções pPROM1 e pPROM3 e os calos encontram-se em processo de seleção (figura 6).

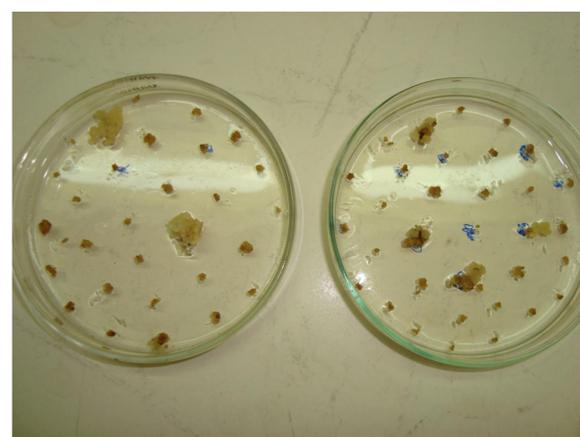


Figura 6. Placas com meio de seleção com higromicina mostrando calos de arroz transformados com as construções pPROM1(esquerda) e pPROM3 (direita) em fase de seleção.

4. Perspectivas

OsAPx4

→ Analisar o padrão de expressão do promotor do gene *OsAPx4* através de ensaios histoquímicos com GUS em tecidos de raiz, folha, caule e panícula das plantas transformadas com a construção pPROM4

OsAPx1 e *OsAPx3*

→ Regenerar plantas transformadas com as construções pPROM1 e pPROM3

→ Confirmar a transgenia das plantas transformadas por PCR

→ Analisar o padrão de expressão do promotor dos genes *OsAPx1* e *OsAPx3* através de ensaios histoquímicos com GUS em tecidos de raiz, folha, caule e panícula das plantas transformadas com as construções pPROM1 e pPROM3

5. Apoio Financeiro

CAPES, CNPq e FAPERGS.