Análise da região promotora do gene OsAPx3 que codifica uma ascorbato peroxidase peroxissomal em arroz

Julio de Andrade Garighan[1], Gisele Passaia[1], Márcia Márgis-Pinheiro[1]

[1]Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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) que é produzida constantemente pelo metabolismo aeróbico, e em situações de estresse biótico ou abiótico tem sua produção aumentada, sendo que em grandes quantidades pode causar diversos danos celulares. Em arroz, a APx é codificada por oito genes, cujos produtos são classificados por sua localização subcelular: citosólica, peroxissomal, mitocondrial ou cloroplastidial. A caracterização dos genes codificadores de APxs 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.

Metodologia

Construção do vetor: uma sequência nucleotídica de aproximadamente 2kb anterior ao sítio de iniciação da tradução do gene foi isolada e clonada no vetor específico para estudo de promotores, pHGWFS7. O vetor contendo a sequência promotora foi denominado PromAPx3 (Figura 1). O pHGWFS7 permite a fusão da sequência promotora com os genes repórteres *Gfp* e *Gus*, além de conferir resistencia a higromicina.

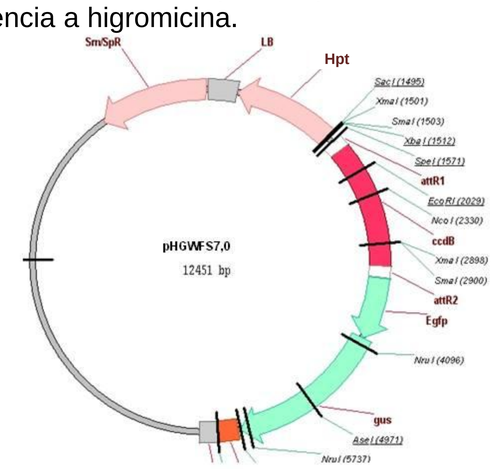

Figura 1. Mapa do vetor pHGWFS7.

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

Ensaio histoquímico de *GUS*: para visualização do padrão de expressão do gene *GUS* guiado pelo promotor, amostras das plantas foram incubadas em solução 1mM de *X-gluc* a 37°C por 16h. Posteriormente as amostras foram mantidas em álcool 70% para descoloração e melhor visualização da marcação obtida.

Análise *in silico:* para a análise *in silico* de cis-elementos na região promotora de OsAPx1 foram utilizadas as seguintes bases de dados disponíveis on-line:-PlantPan (plantpan.mbc.nctu.edu.tw/) e plantcare (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare /html /)

Quantificação da atividade de *Gus* por ensaio fluorimétrico: Conteúdo de proteína total foi extraído a partir de folhas de plantas adultas e a atividade de *Gus* foi medida pela fluorescência de MUB, produto da clivagem realizada por *Gus*. A Leitura da fluorescência foi medida em 460nM de emissão e 590nM de absorbância nos tempos 0, 30 minutos, 1 hora e 2 horas de reação.

Experimento de privação de água: Plantas das linhagens testadas no experimento de quantificação da expressão de *Gus* por ensaio fluorimétrico tiveram seus vasos retirados das bacias de água em que estavam por 16 horas. Amostras de tecidos foram recolhidas após este período, e incubadas em *X-Gluc.*

Resultados e Discussão

Foram obtidas seis linhagens contendo o plasmídeo PromAPx3. A confirmação do transgene foi verificada por PCR usando primers específicos para os genes *Hpt* e *Gus*.

A busca *in silico* por *cis*-elementos indicou que a APx3 teria sua expressão modulada pela luz, anaerobiose, giberelina e déficit de açúcar na célula. E os possíveis orgãos em que ocorrem a expressão seriam nas folhas, sementes e meristema apical.

Apartir do teste histoquimico de *GUS*, obtivemos marcações nas folhas (no mesófilo), e nas anteras na fase R4/R5 (Figura 2). Foi realizado a quantificação da expressão de *Gus* nas folhas de plantas em R4/R5 (Figura 3), com confirmação de expressão estatisticamente diferente em relação ao controle não-transformado.

Busca em bancos de dados de microarranjos indicou uma expressão diferencial de APx3 em resposta a seca, com intensificação da expressão. Para verificar quais tecidos apresentavam tal resposta, foi realizado o experimento de déficit hídrico em plantas nas fases R4/R5 (figura 4)

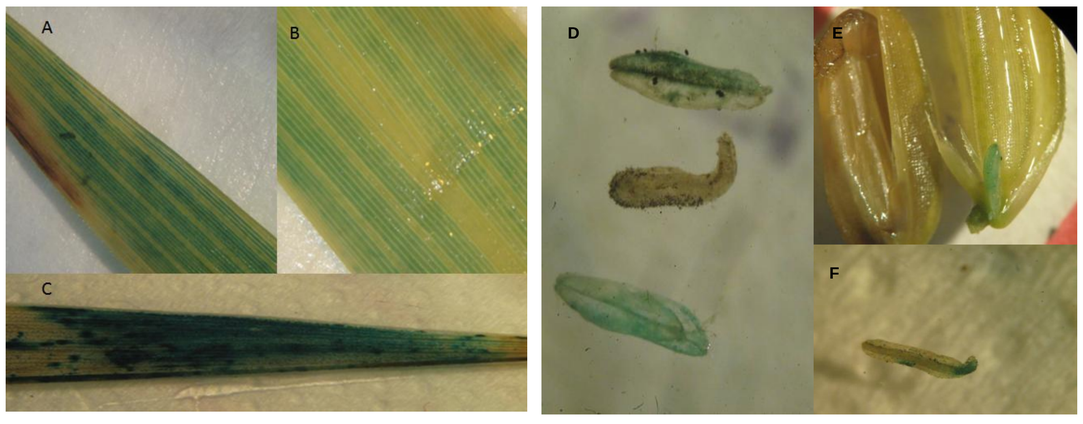

Figura 2. Marcação do ensaio histoquímico de *Gus* em condição controle: (A) e (B), ao longo dos vasos condutores; (C), folha senescente; (D), anteras em R4; (E), antera em R5; (F), antera em R6.

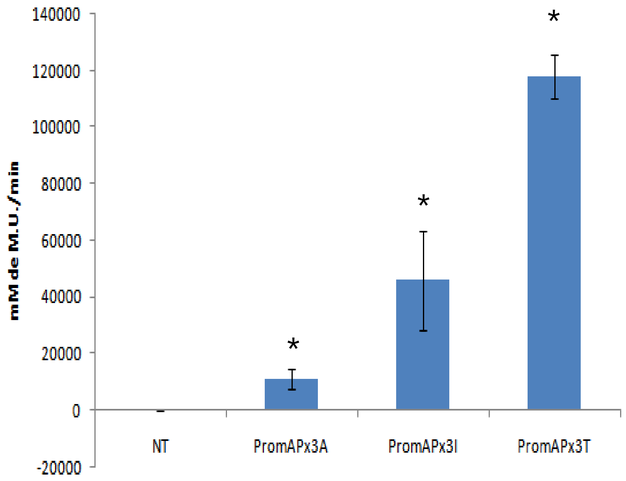

Figura 3. Ensaio fluorimétrico para medição da atividade de *Gus* nas folhas das linhagens PromAPx3A, PromAPx3I e PromAPx3T.

Test t-student: * p≤ 0.05

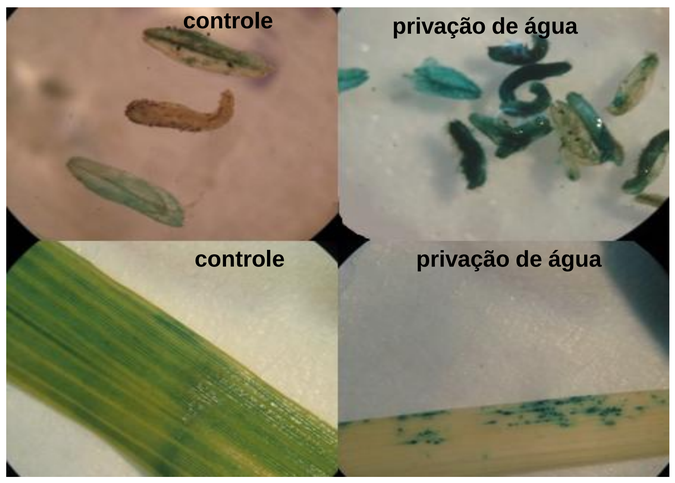

Figura 4. Experimento de privação de água.
Na coluna da esquerda: amostras de antera e folha em condição padrão. Coluna da direita: amostras dos mesmos órgãos após passar por déficit hídrico de 16 horas.

Há intensificação da marcação na antera após a seca, enquanto que nas folhas há redução da marcação

Conclusão e Perspectivas

Os resultados obtidos com as plantas PromAPx3 corroboraram os dados provenientes do banco PlantPan (busca de cis-elementos): expressão em tecidos reprodutivos e fotossintetizantes. O ápice da intensidade de marcação de *Gus* no ensaio histoquímico foi em folhas e anteras nas fases R4/R5, com expressão diferencial em relação ao controle.

Foi visualizada forte marcação de Gus em resposta ao estresse de seca nas anteras e diminuição da expressão nas folhas bandeira. Os resultados conflitantes com dados de microarranjo podem indicar:

1- Resposta a seca diferente em fase vegetativa e reprodutiva;

2- Possível existência de *cis*-elementos fora dos 2kb utilizados no estudo;

Os resultados obtidos são semelhantes com os observados no estudo do promotor do gene APx4, que apresentou marcação nas anteras e estigma (fases reprodutivas).

Perspectivas:

1) Quantificar, através de ensaios fluorimétricos a modificação da expressão gênica em resposta à seca, tanto nas folhas bandeiras quanto nas anteras;
2) Entender a coexpressão de *OsAPx3* e *OsAPx4* nas fases reprodutivas das plantas de arroz;
3) Testar se *OsAPx4* também é coexpressa com *OsAPx3* em diversas condições ambientais; e compreender melhor o papel da APx3 e a regulação de sua expressão em resposta á seca;

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPERGS