

Expressão do gene OsASR5 em *Nicotiana tabacum*

Marcelo A. B. Martins¹

Marcia M. A. N. P. Margis²

¹Graduando em Biotecnologia – UFRGS

²Departamento de Genética Vegetal - UFRGS



Introdução

O alumínio constitui um dos fatores limitantes mais impactantes para a atividade agrícola mundial, constituindo cerca de 7% da massa da crosta terrestre, sendo o metal mais abundante. Sua toxicidade se dá através da sua solubilização, que ocorre em solos ácidos (pH menor que 5,0), os quais constituem cerca de 40% dos solos aráveis no mundo. Estudos com genes que tenham sido indicados como alvos para a pesquisa de resistência a estresses causados pela alta concentração de Al são de grande importância para o desenvolvimento de culturas mais tolerantes a estas adversidades. Nesse contexto, os genes *ASR* (do inglês *abscisic acid, stress and ripening*) desempenham um importante papel, pois têm sido relacionados à resposta da planta a estresses abióticos. O gene *ASR5* de arroz (*OsASR5*) tem sua expressão modulada em resposta a altas concentrações de alumínio. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a participação de *OsASR5* na tolerância a diferentes pHs, diferentes concentrações tóxicas de alumínio e de sal em plantas de tabaco.

Materiais e Métodos

Transformação de *Nicotiana tabacum*

Plantas de tabaco super-expressando o gene *OsASR5* e *OsASR5* em fusão traducional com GFP foram previamente obtidas, através da transformação de discos foliares co-cultivados com *Agrobacterium tumefaciens* (LB4404) portando o vetor pCAMBIA3200-ASR5.

Confirmação da transgenia

Para a confirmação da transgenia dois métodos diferentes foram aplicados:

- Confirmação por RT-qPCR, que, para o qual, foi sintetizado cDNA e então feita a reação com primers específicos para o gene *OsASR5* para mostrar a expressão diferencial da planta transgênica em comparação com a selvagem.
- Confirmação por PCR a partir de extração de DNA total e primer para NPTII (sequência do gene marcador de seleção).

Ensaio de resistência

Com o intuito de comparar fenotipicamente as plantas transgênicas com as não transformadas foram utilizados meios MS (Murashige e Skoog) com antibiótico de seleção (canamicina - 50uM) e o fator de estresse abiótico:

- pH: Para simular solos ácidos foram preparadas placas com meio em diferentes pHs variando de 3,5 a 5,8.

Resultados

Foram obtidas 9 linhagens expressando a proteína de fusão ASR5-GFP e 23 linhagens superexpressando a proteína ASR5. Análises moleculares de 13 linhagens revelaram que essas plantas contêm o transgene (Figura 1). A avaliação dos níveis de expressão das plantas superexpressando o gene *ASR5*, mostram que as 5 linhagens transgênicas analisadas expressam níveis aumentados do gene quando comparadas a uma planta selvagem (Figura 2). Essas plantas foram submetidas ao tratamento com meio de cultura com pH ácido (pH 4,0 e 4,5). Resultados preliminares indicam que as plantas superexpressando o gene são mais resistentes a pH baixo (Figura 3). A comparação de diferentes linhagens em uma mesma situação revela que as plantas transgênicas são maiores do que as plantas não transformadas.

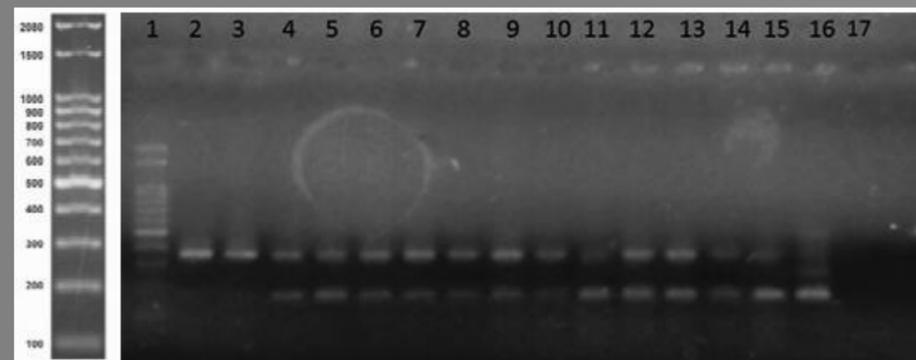


Figura 1. PCR utilizando primers para *OsASR5* para a confirmação da transgenia. Com o material resultante da extração de DNA total de plantas não transformadas e transgênicas foi feito um PCR utilizando um par de primers para amplificar o gene *OsASR5*.

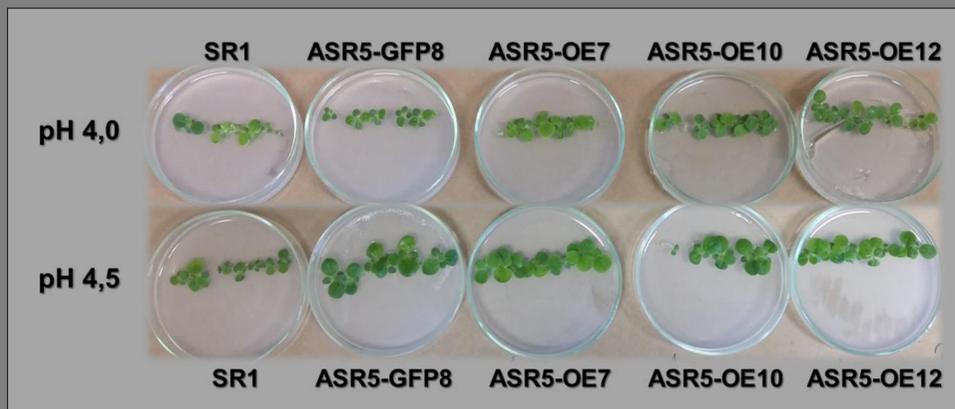


Figura 3. Plantas submetidas a meio ácido. Foi analisada a resistência de diferentes linhagens de tabaco transformadas (*ASR5-GFP8*, *ASR5-OE7*, *ASR5-OE10*, *ASR5-OE12*) em comparação com uma não transformada (*SR1*) em meios com pH ajustado para 4 (parte superior) e 4,5 (parte inferior). As placas contendo as plantas transgênicas foi suplementado com canamicina.

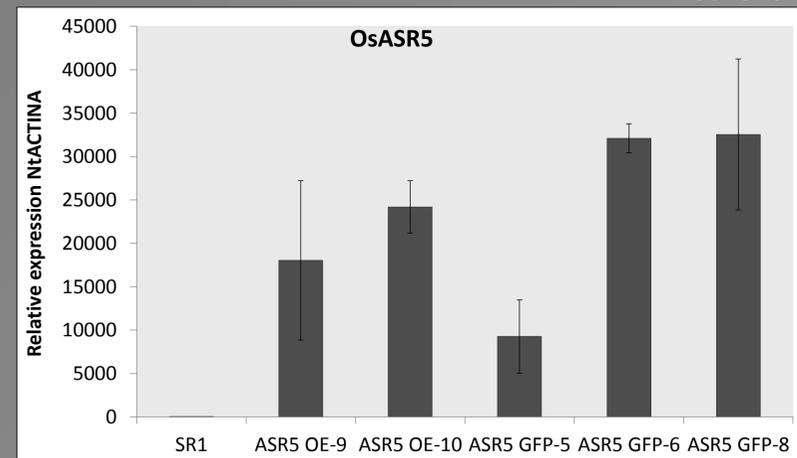


Figura 2. Expressão do gene *OsASR5* em plantas transgênicas e não transformada. A expressão foi avaliada por RT-qPCR utilizando cDNA de plantas transgênicas (*ASR5-OE9*, *ASR5-OE10*, *ASR5-GFP5*, *ASR5-GFP6*, *ASR5-GFP8*) e selvagens (*SR1*).

Perspectivas

Para o futuro está sendo planejada a realização de novos experimentos de resistência a meios ácidos, assim como a alumínio e a sal. Em seguida, serão realizadas novas reações de RT-qPCR para analisar o perfil de expressão de genes relacionados com a homeostase de pH que foram previamente identificados, em experimentos de RNA-seq, como diferencialmente expressos nas plantas silenciadas para *OsASR5* (Arenhart et al, 2014)



Referências:

Oh E, Zhu J-Y, Bai M-Y, Arenhart RA, Sun Y, Wang Z-Y. Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the Arabidopsis hypocotyl. McCormick S, ed. eLife. 2014;3:e03031. doi:10.7554/eLife.03031.

Suporte financeiro

