

# Análise do papel do gene *OsASR5* nas respostas a estresses abióticos utilizando *Nicotiana tabacum* como modelo

Marcelo A. B. Martins<sup>1</sup>  
Marcia M. A. N. P. Margis<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Biotecnologia – UFRGS  
<sup>2</sup>Departamento de Genética Vegetal - UFRGS

## Introdução

Por serem organismos sesséis, as plantas estão constantemente submetidas a todo tipo de estresse, biótico ou abiótico. Decorrente de milhares de anos de evolução, estes organismos desenvolveram mecanismos, que hoje, atuam como minimizadores dos danos causados por estressores. Dessa forma, a identificação de genes que contribuam para a resistência a tais estresses é de grande importância para o desenvolvimento de culturas mais tolerantes a estas adversidades. Neste contexto, os genes ASR (do inglês *abscisic acid, stress and ripening*), que desempenham um importante papel, tanto como chaperonas quanto como fatores de transcrição, têm sido relacionados como importantes componentes para a resposta da planta a estresses abióticos, incluindo salinidade, seca e alumínio. O presente projeto tem como objetivo avaliar a participação de *OsASR5* na tolerância aos estresses causados pela alta salinidade, pela acidez do solo e pela toxidez do alumínio em plantas de tabaco. Para tal, foram obtidas 9 linhagens expressando a proteína de fusão ASR5-GFP e 23 linhagens superexpressando a proteína ASR5. Análises moleculares prévias revelaram que essas plantas contêm o transgene. Além disso, foram avaliadas 3 linhagens ASR-GFP e 2 linhagens ASR5 em relação aos níveis de expressão dos transgenes e todas elas expressam níveis aumentados do gene quando comparadas a uma planta selvagem, e tais plantas, quando submetidas a tratamento em meio ácido, se mostraram mais resistentes. No presente trabalho, essas plantas transgênicas foram avaliadas quanto a tolerância a sal. Um sistema de hidroponia para a avaliação da resposta ao alumínio está sendo desenvolvido. Além disso, a localização subcelular da proteína foi avaliada.

## Materiais e métodos

### Localização subcelular em microscópio confocal

As amostras de tecido foliar de plantas transgênicas expressando a proteína de fusão ASR5-GFP foram submetidas à análise por microscopia confocal de fluorescência (Olympus FluoView 1000). A excitação da auto-fluorescência da clorofila foi feita a 635 nm com a detecção da emissão a 670-700 nm. A excitação da proteína de fusão GFP foi feita a 488 nm e a emissão a 510-550 nm.

### Ensaio para avaliação de tolerância a estresse salino

Sementes de tabaco foram germinadas em meio MS sólido em placas de Pétri posicionadas verticalmente. Após duas semanas, três plantas foram transferidas para meio MS sólido, acrescido de NaCl (100mM) em placas também mantidas na posição vertical. A cada semana as plantas eram fotografadas, e o tamanho das raízes era mensurado, utilizando o programa ImageJ. A análise completa teve a duração de 14 dias. Esse processo foi realizado para as 23 linhagens expressando a proteína ASR5. Como controle foi utilizada uma linhagem não transformada.

## Resultados

A Figura 1 mostra a localização subcelular da proteína de fusão GFP-ASR5, na qual pode-se inferir que a proteína recombinante está localizada no núcleo, como é característico da proteína ASR5, visto que ela é conhecida como um fator de transcrição.

Com o intuito de avaliar a capacidade dos genes *OsASR5* em conferir tolerância a estresse salino, foi realizado teste em meio MS sólido salinificado para observar quais linhagens respondem melhor a essa adversidade. Diversas linhagens superexpressando o gene foram testadas, sendo que 3 delas apresentaram alta tolerância e mantiveram crescimento sob condições de salinidade (Figura 2).

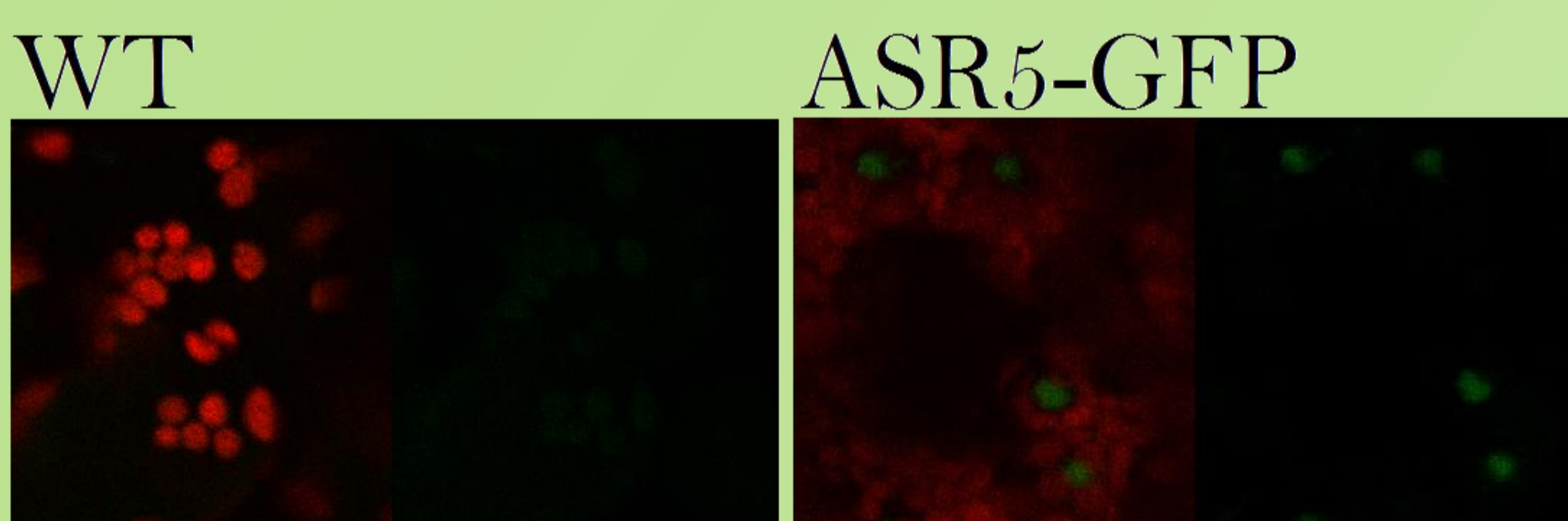


Figura 1. Localização subcelular da proteína ASR5 fusionada à proteína GFP visualizada em microscópio confocal.

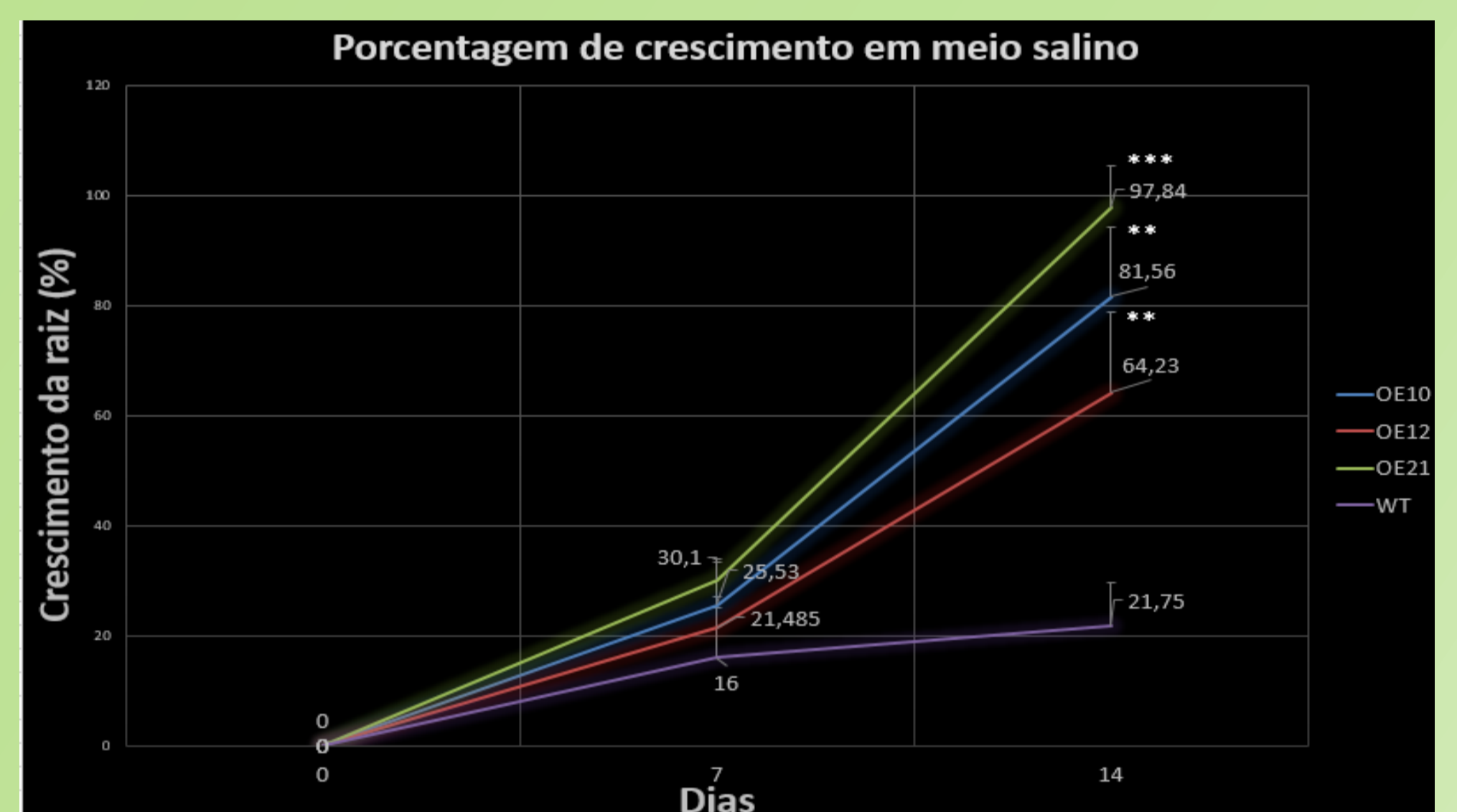


Figura 2. Gráfico com os dados de porcentagem de crescimento de raiz de plantas de tabaco em relação ao início do experimento. As plantas controle, não transformadas, e as linhagens transgênicas são indicadas por diferentes cores, segundo a legenda.



Figura 3. Modelo de crescimento em hidroponia de plantas de tabaco. As bases de ponteiros de micropipeta foram usadas como suportes para meio sólido MS, no qual as sementes foram germinadas.

Para a realização dos experimentos com alumínio, foi definido, como melhor método, o crescimento das plantas em meio hidropônico. Para isso foi desenvolvido um sistema utilizando meio sólido em ponteiros de micropipeta, que estão em contato com meio líquido na sua parte inferior (Figura 3). Esse meio sólido serve como suporte para a germinação das sementes. Dessa maneira, durante a germinação e o crescimento inicial, a raiz estará em contato com o meio sólido, e em seguida, atingirá o meio líquido. Este último poderá ser alterado de acordo com o estresse que se deseja induzir (por exemplo, diferentes concentrações de alumínio).

## Perspectivas

Com o modelo de hidroponia já pronto e otimizado, tem-se como próximos passos a realização dos experimentos de resposta ao alumínio e avaliação dos resultados.

## Suporte financeiro