

Julio de Andrade Garighan<sup>1</sup>, Carolina Werner Ribeiro<sup>1</sup>, Márcia Márgis-Pinheiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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 de entrada pENTR e recombinado no vetor para estudo de promotores pHGWFS7. O vetor contendo a sequência promotora foi denominado pPROM1 (Figura 1). O pHGWFS7 permite a fusão da sequência promotora com os genes repórteres *Gfp* e *Gus*, além de conferir resistência a higromicina.

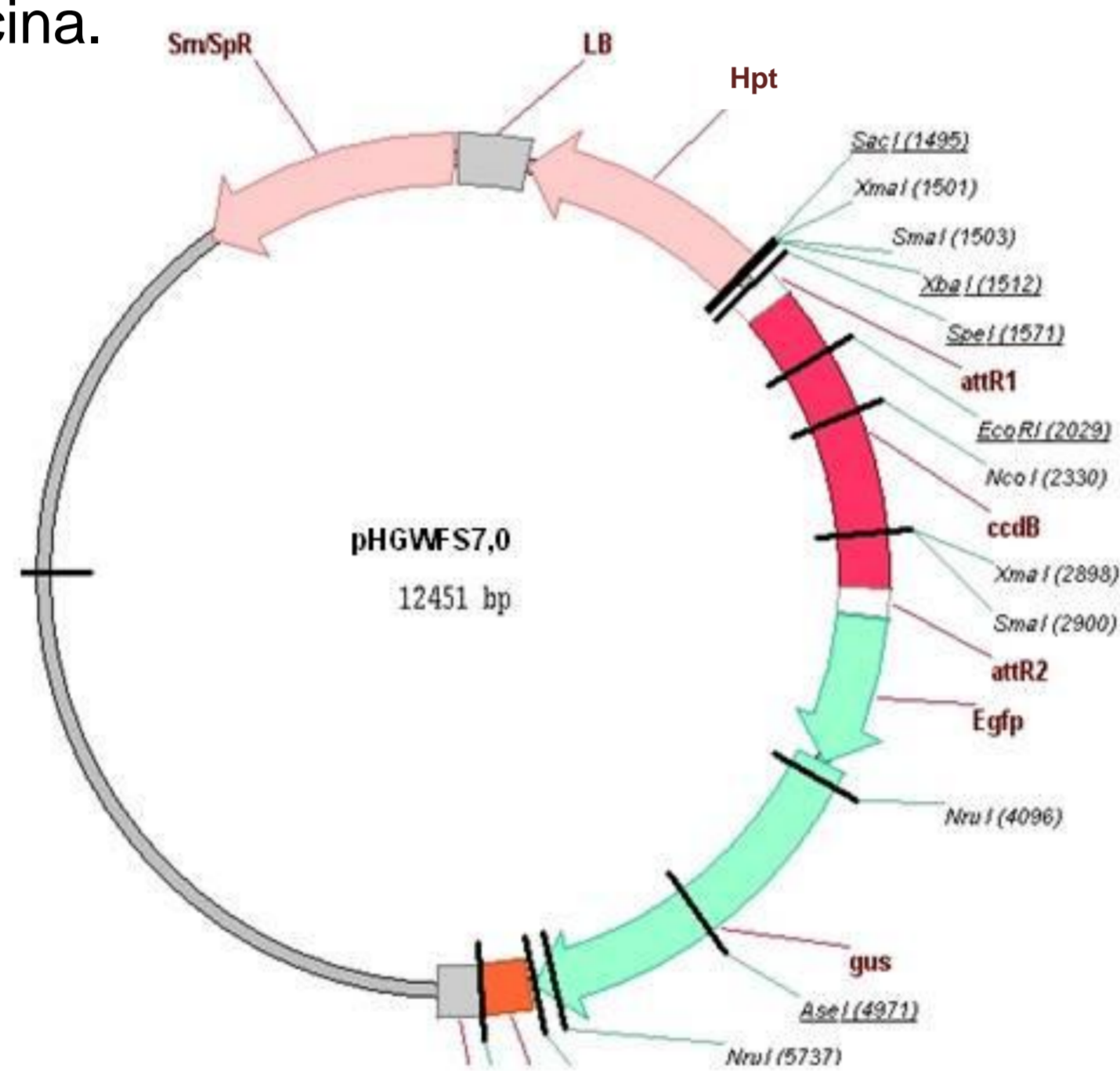


Figura 1. vetor pHGWFS7

**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/](http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/)) e plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

**Teste cis elementos:** perfilhos foram aclimatados em hidroponia por 5 dias e após receberam adição de um dos dois hormônios (ácido abscísico e 6-Benzylaminopurina), os quais foram preditos, na análises *in silico*, como afetantes do padrão de expressão do gene. Esses hormônios foram adicionados nas soluções nutritivas, a 50 µM cada. As coletas foram feitas em 2, 5 e 7 dias.

## Resultados e Discussão

Foram obtidas seis linhagens contendo o plasmídeo pPROM1. A confirmação do transgene foi verificada por PCR usando primers específicos para os genes *Hpt* e *Gus*. As plantas regeneradas foram transferidas para cultivo em solo e aclimatadas em casa de vegetação em condições padrão (ciclo diário de 16h de luz a 28°C).

Apartir do teste histoquímico de *GUS*, obtivemos marcações nas folhas, especificamente no mesófilo, lígula e em tecidos lesionados (Figuras 2 e 3).

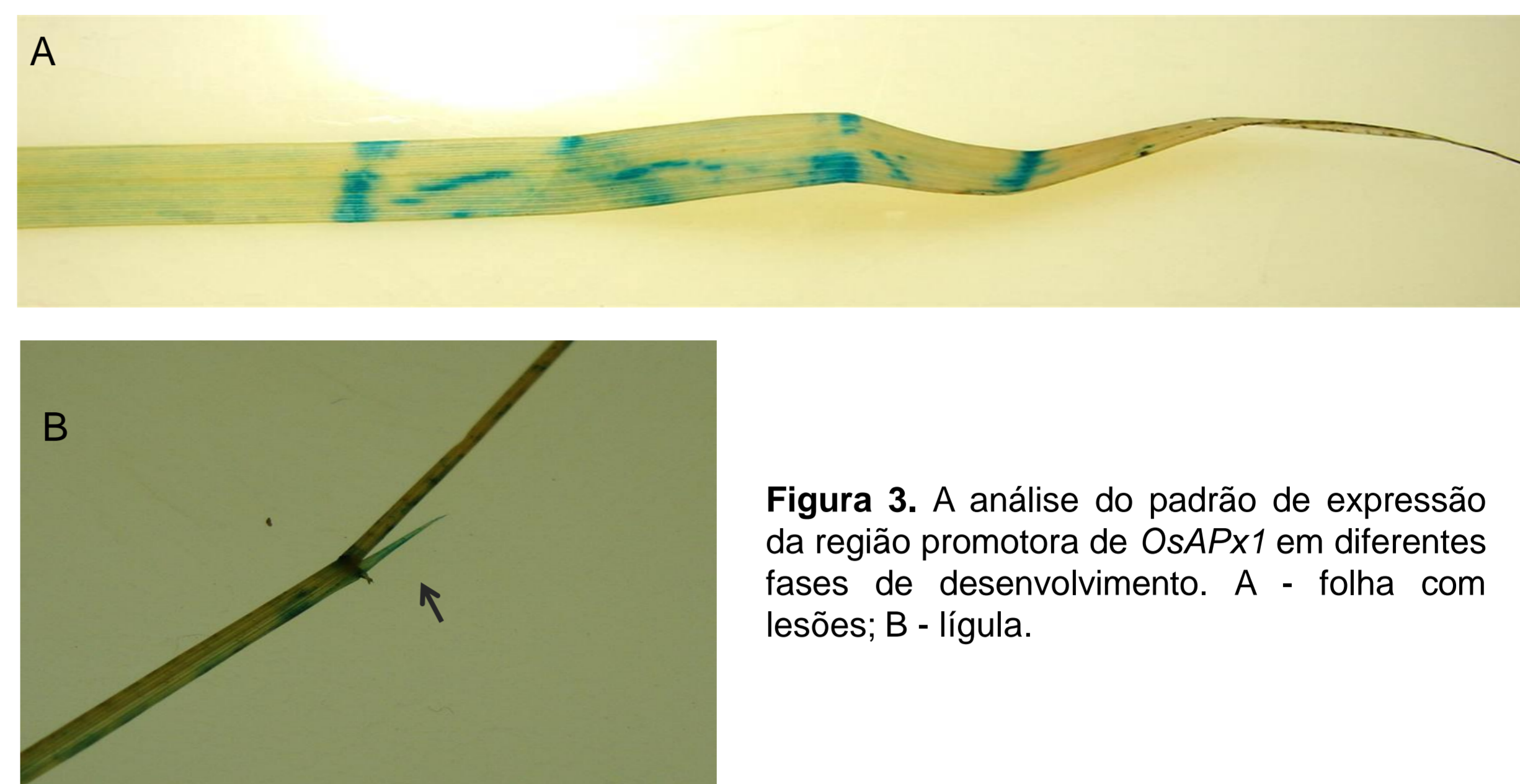


Figura 3. A análise do padrão de expressão da região promotora de *OsAPx1* em diferentes fases de desenvolvimento. A - folha com lesões; B - lígula.

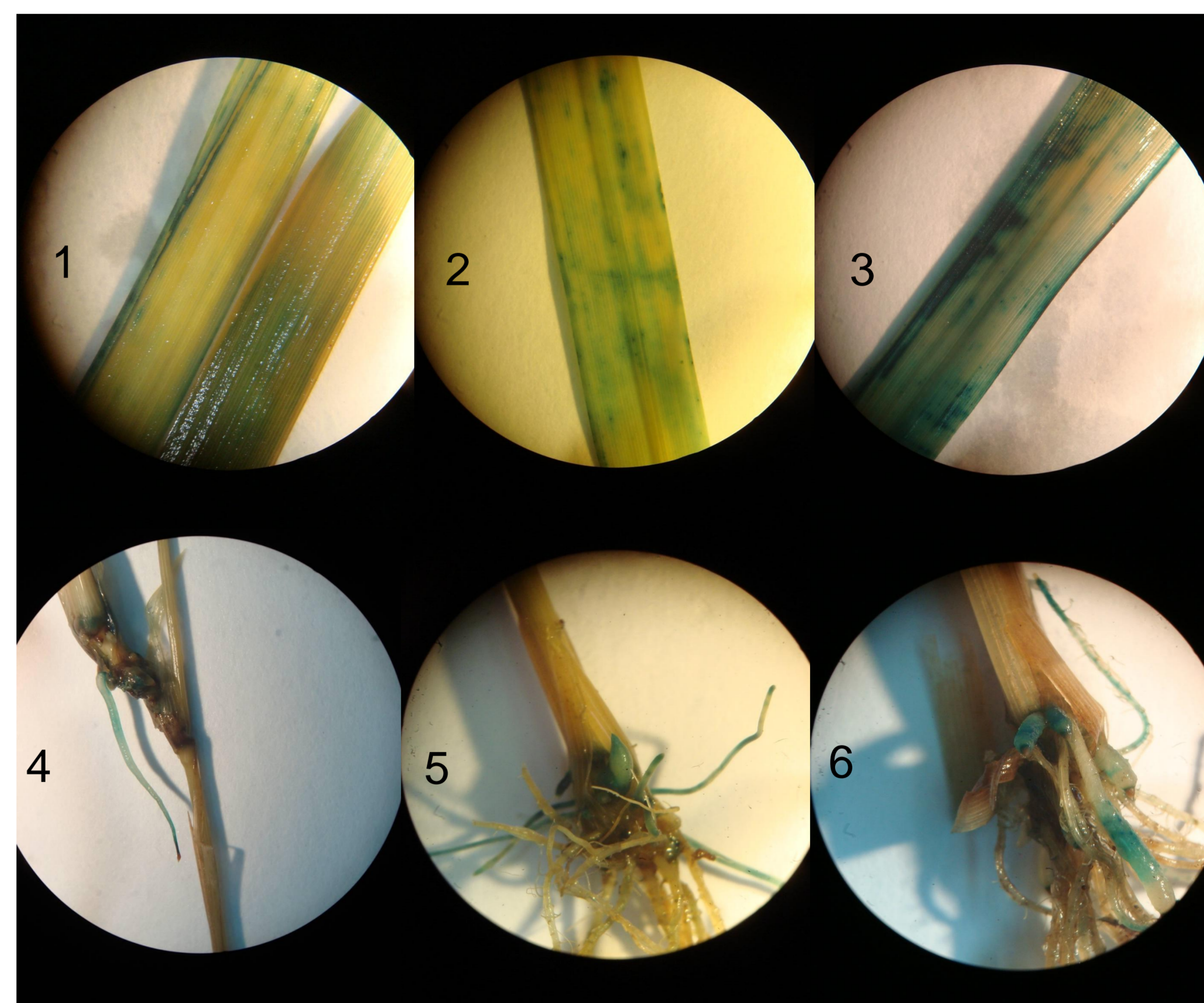


Figura 4. Marcação do ensaio histoquímico de *GUS* após manutenção em solução nutritiva com hormônios a 50µM de por 2 dias. 1 e 4. controle; 2 e 5. 6-Benzylaminopurina (BAP); 3 e 6. ácido abscísico (ABA).

## Conclusão e Perspectivas

Estes resultados mostram que o gene *OsAPx1* é expresso em tecidos verdes e responde a danos. Aparentemente, não existe qualquer alteração no padrão de expressão em diferentes fases de desenvolvimento. A busca *in silico* revelou a presença de cis-elementos de resposta a seca, luz e hormônios vegetais, entre outros.

O ensaio com os dois hormônios para os quais foram encontrados cis-elementos preditos confirmou a funcionalidade dos mesmos. Pode-se verificar alterações na morfologia das raízes e brotos dos perfilhos, e com marcação diferencial nos órgãos alterados e nas raízes novas, sendo a marcação no controle majoritariamente nas raízes pré-existentes ao ensaio, enquanto que os brotos e raízes alterados dos perfilhos com hormônios desenvolveram-se ao longo do teste, com intensificação do crescimento de raízes para as testadas com ABA e de brotos para as com BAP. Nas folhas e panículas não houve alterações na morfologia, mas intensificação das marcações que já ocorrem no mesófilo. Esses resultados mostram uma resposta forte em 2 dias, exigindo a realização de coletas em espaços menores de tempo, para análise mais fina.

**Perspectivas:** realizar cortes histológicos dos segmentos de plantas e submeter as plantas transformadas a estresses para verificar mudanças no padrão de expressão do gene *OsAPx1*. Testar outros cis-elementos preditos. Realizar a quantificação de *GUS* nos tecidos que já demonstraram ter expressão dependente dos cis-elementos.

**Apoio financeiro:** CAPES, CNPq e FAPERGS