



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1106382-3 A2



* B R P I 1 1 0 6 3 8 2 A 2 *

(22) Data de Depósito: 28/10/2011
(43) Data da Publicação: 12/11/2013
(RPI 2236)

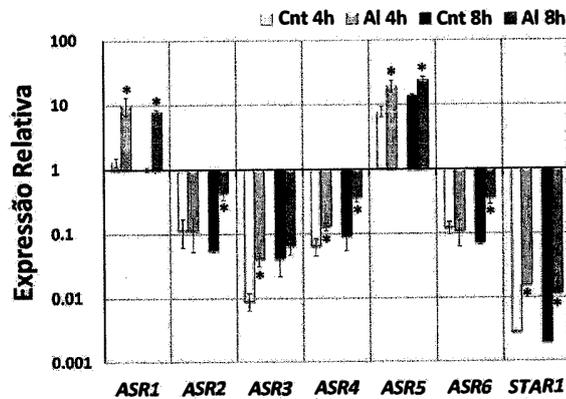
(51) Int.Cl.:
C12N 15/29
C12N 15/63
C12N 15/82

(54) **Título:** CONSTRUÇÃO GÊNICA PARA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM PLANTAS, CÉLULA TRANSFORMADA, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A METAIS DE PLANTAS, E PROCESSO PARA CONTROLE DA MODULAÇÃO DE TOLERÂNCIA A METAIS

(73) **Titular(es):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) **Inventor(es):** Júlio César de Lima, Márcia Maria Auxiliadora Naschnveng Pinheiro Margis, Rafael Augusto Arenhart, Rogério Margis

(57) **Resumo:** CONSTRUÇÃO GÊNICA PRA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM PLANTAS, CÉLULA TRANSFORMADA, PROCESSO PARA MODULAR A TOLERÂNCIA A METAIS DE PLANTAS, E PROCESSO PARA CONTROLE DA MODULAÇÃO DE TOLERÂNCIA A METAIS. A presente invenção proporciona construções gênicas, células transformadas, processos para modular a tolerância a metais em plantas, processo para controle da modulação de tolerância a metais. Os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum o uso de proteínas ASR (ABA, Stress and Ripening) de forma indireta para modular a atividade de outros materiais biológicos que contribuem para a proteção celular contra metais especialmente contra Alumínio (Al).



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CONSTRUÇÃO GÊNICA PARA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM
PLANTAS, CÉLULA TRANSFORMADA, PROCESSO PARA MODULAR A
TOLERÂNCIA A METAIS DE PLANTAS, E PROCESSO PARA CONTROLE DA
5 MODULAÇÃO DE TOLERÂNCIA A METAIS

Campo da Invenção

A presente invenção está no campo de Biotecnologia e Biologia
Molecular. A presente invenção proporciona construções gênicas, células
10 transformadas, processos para modular a tolerância a metais em plantas, e
processo para controle da modulação de tolerância a metais. Os objetos da
invenção têm como conceito inventivo comum o uso de proteínas ASR (ABA,
Stress and Ripening) de forma indireta para modular a atividade de outros
materiais biológicos que contribuem para a proteção celular contra metais,
15 especialmente contra Alumínio (Al).

Antecedentes da Invenção

O Alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre,
compreendendo aproximadamente 7% de sua massa e não é de regra um
20 nutriente essencial, mas, em pequenas quantidades pode ajudar no
crescimento das plantas e induzir efeitos desejados (Foy, 1983). A maioria do
Al encontra-se ligado em quelantes ou apresenta-se em forma não tóxicas
como alumino silicatos ou precipitados. A toxicidade pelo Al ocorre pela sua
solubilização em solos com condições ácidas (pH abaixo de 5,0), (Famoso *et*
25 *al.* 2010). Foi estimado que aproximadamente 50 % das terras aráveis no
mundo são negativamente impactadas pelo Al devido aos solos ácidos (Panda
et al. 2009). A toxicidade ao Al é considerada um dos maiores fatores limitantes
na produção agrícola (Matsumoto 2000), inibindo o crescimento das raízes e a
absorção de minerais (Liu & Luan 2001), levando a uma redução do sistema
30 radicular, que afeta diretamente a absorção de água e nutrientes. Existem

diversos possíveis sítios de ligação que podem ser afetados pela interação com o Al incluindo a parede celular, a superfície da membrana plasmática, o citoesqueleto e o núcleo (Panda *et al.*, 2009). Além disso, o Al liga-se fortemente a parede celular de células epidermais e corticais da raiz (Delhaize *et al.* 1993).
5 Entretanto, algumas plantas são capazes de tolerar níveis tóxicos de Al em solos ácidos. Estas plantas desenvolveram mecanismos para detoxificar o Al interna e externamente (Kochian *et al.* 2005).

No sistema de detoxificação interna, as plantas acumulam Al nos vacúolos quelando-os com ácidos orgânicos (AO) como citrato e oxalato (Ma
10 2007). Por outro lado, a maioria das plantas tolerantes exclui o Al do ápice da raiz liberando ácidos orgânicos como malato, citrato e oxalato no solo (Ma *et al.* 2001; Kochian *et al.* 2005). O complexo AO-Al previne a entrada do Al na célula reduzindo a concentração e a toxicidade do Al ao ápice da raiz (Ma *et al.* 2001) em espécies como cevada e trigo (Sasaki *et al.* 2004; Magalhaes *et al.* 2007).

15 O arroz é considerado o cereal mais tolerante ao Al (Fageria 1989; Duncan & Baligar 1990), mas existe variabilidade entre genótipos, sendo esta tolerância amplamente diferente entre cultivares (Ferreira 1995). Em dois estudos independentes, Ma *et al.* (2002) e Yang *et al.* (2008) observaram um aumento do acúmulo de Al no ápice da raiz de uma cultivar sensível
20 comparada a cultivar tolerante sem a ocorrência de exudação de ácidos orgânicos. Estes resultados demonstraram que altos níveis de tolerância ao Al são mediados por um novo mecanismo em arroz, que é independente da exclusão de ácidos orgânicos (Famoso *et al.* 2010).

Apesar de estudos genéticos terem identificados mais de dez
25 “quantitative trait loci (QTL)” para tolerância ao Al em arroz, genes responsáveis não foram clonados até recentemente (Huang *et al.* 2009). Os genes STAR1 e STAR2 foram isolados de uma cultivar tolerante ao AL previamente irradiada com raios gama (Ma *et al.* 2005). A disrupção de qualquer um dos genes resultou em hipersensibilidade e toxicidade ao Al.
30 STAR1 codifica uma proteína com domínio de ligação a nucleotídeo, enquanto que STAR2 codifica uma proteína com domínio trans-membrana do tipo

transporte ABC. Análises indicam que STAR1 e STAR2 formam um complexo que funciona como um transporte do tipo ABC, que é requerido na detoxificação do Al em arroz. O transporte ABC transporta UDP-glicose, que pode ser usado para modificar a parede celular (Huang *et al.* 2009). Yamaji *et al.* (2009) isolaram um fator de transcrição do tipo dedo de zinco chamado ART1 que regula múltiplos genes implicados na tolerância ao Al em arroz incluindo STAR1, STAR2 e Nrat1 que é um transportador específico para o íon trivalente de Al em arroz, requerido na detoxificação interna através do sequestro em vacúolos (Xia *et al.* 2010).

10 Usando uma abordagem proteômica, Yang *et al.* (2007) identificaram proteínas responsivas ao Al em raízes de arroz, entre elas, ASR5 que apresentou aumento de sua expressão. Os genes ASR (Abscisic acid, Stress and Ripening) foram inicialmente descritos em tomate (Iusen *et al.* 1993). Subsequentemente, os genes ASR foram identificados em batata (Silhavy *et al.* 15 *et al.* 1995), pinus (Chang *et al.* 1996), milho (Riccardi *et al.* 1998), arroz (Vaidyanathan *et al.* 1999), cana-de-açúcar (Sugiharto *et al.* 2002), uva (Cakir *et al.* 2003) dentre outros, sendo amplamente e restritamente distribuídos no reino vegetal. Intrigantemente, os genes ASR não ocorrem no genoma de *Arabidopsis thaliana* (Maskin *et al.* 2001). Os genes ASR são induzidos em 20 resposta a ABA, diversos estresses abióticos incluindo seca e estresse salino e também durante o amadurecimento de frutos (Carrari *et al.* 2004). Kalifa *et al.* (2004) demonstraram que a proteína ASR1 de tomate encontra-se localizada no citosol como um monômero desestruturado e um homodímero estruturado no núcleo, onde pode se ligar a DNA. A proteína ASR1 citosólica possui uma 25 atividade de chaperona e pode estabilizar diversas proteínas protegendo-as contra experimentos de desnaturação (Konrad & Bar-Zvi 2008). Além do mais, a proteína ASR de uva liga-se ao promotor de um gene que codifica um transportador de hexose (Cakir *et al.* 2003), sugerindo um papel como fator de transcrição envolvido no metabolismo de açúcar. Análises *in silico* revelaram 30 em arroz seis cópias do gene ASR no genoma, mapeados em diferentes cromossomos e confirmados por ESTs (Frankel *et al.* 2006).

Na presente invenção, foi desenvolvido o uso da expressão de genes da família ASR na proteção ao Al. Os resultados da invenção indicam que todos os membros da família ASR possuem um grau de expressão variável, mostrando que os genes ASR são diferencialmente regulados em resposta ao Al na cultivar tolerante Nipponbare. Por outro lado, ASR5 não responde a exposição ao Al em raízes do arroz da cultivar Taim, que em contraste a cultivar Nipponbare, apresenta alta sensibilidade ao Al (Freitas *et al.* 2006). De acordo com Ma *et al.* (2002), de uma maneira geral, cultivares da subespécie Japonica são mais resistentes ao Al do que cultivares da subespécie Indica. Em adição aos dados de expressão, plantas transgênicas silenciadas para os genes ASR foram obtidas e um aumento da susceptibilidade ao Al foi observado nas plantas da geração T1. Além disso, calos embriogênicos de arroz transformados com a fusão ASR5-GFP revelaram a localização nuclear e citoplasmática da proteína ASR sugerindo um papel como fator de transcrição.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta, aos olhos dos inventores, possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona novas e inventivas construções gênicas e processo para modular a tolerância de plantas ao alumínio compreendendo, como conceito inventivo comum, a modulação, em plantas, da atividade biológica de material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

É, portanto, um objeto da presente invenção construções gênicas heterólogas compreendendo pelo menos um material biológico relacionado à manipulação da expressão dos genes ASR (Aba, stress and ripening).

É, portanto, um objeto adicional da presente invenção células transformadas compreendendo construções gênicas heterólogas com material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

É, ainda, outro objeto adicional da presente invenção um processo para modular a tolerância de plantas a metais compreendendo a modulação, em plantas, da atividade biológica de material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

5 É um objeto adicional da presente invenção um processo para controle de tolerância a metais em plantas compreendendo a quantificação da modulação da atividade de material biológico relacionado ao ASR em plantas. Em uma realização preferencial, essa quantificação compreende a contagem de transcritos de material biológico relacionado a ASR em plantas.

10 A presente invenção proporciona também plantas transformadas compreendendo construções gênicas heterólogas compreendendo material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening). Em uma realização preferencial, a modulação da atividade de ASR atua de forma indireta na tolerância a metais, modulando a atividade de outros materiais
15 biológicos presentes na planta de forma que a atuação conjunta desses materiais é responsável para proteção da planta contra metais, especialmente Al.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão
20 descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 demonstra que a Família gênica ASR responde ao estresse de alumínio. Determinação dos níveis de expressão da família ASR de arroz,
25 em resposta ao tratamento com Al. O RNA total foi extraído a partir de raízes e usado para a síntese de cDNA. As análises foram conduzidas por RT qPCR. Raízes da cultivar Nipponbare foram coletadas após 4 e 8 horas de tratamento com Al (150µM) Os valores representam a média + / -. SD (N = 4). Os asteriscos indicam médias estatisticamente diferentes: (*) P <0,05.

30 A Figura 2 demonstra que o ASR5 não responde ao estresse por Al na cultivar sensível. O RNA total foi extraído de raízes e parte aérea, e utilizado

para a síntese do cDNA. As análises foram conduzidas por RT qPCR. Raízes e parte aérea da cultivar Nipponbare e raízes da cultivar Taim foram coletadas após 8 horas de tratamento com Al (450 μ M). Os valores representam a média + / - SD (N = 4). Os asteriscos indicam médias estatisticamente diferentes: (*) P <0,05.

A Figura 3 demonstra que os níveis de expressão de ASR5 aumentam drasticamente no ápice radicular após a exposição ao Al. O RNA total foi extraído das raízes, e utilizado para a síntese do cDNA. As análises foram conduzidas por RT qPCR. Após 8 horas de tratamento com Al (450 μ M), raízes da cultivar Nipponbare foram coletados e divididos em dois segmentos: a base e o ápice (0,5 cm). As barras com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, P <0,05).

A Figura 4 demonstra a caracterização de plantas ASR-RNAi. (A) O RNA total foi extraído de folhas, e utilizado para a síntese do cDNA. As análises foram conduzidas por RT qPCR. As medições foram realizadas utilizando folhas de 3 semanas das plantas ASR-RNAi (barras cinza) e não-transformados (NT) (barras brancas) cultivadas sob condições normais. Os valores representam a média + / - SD (N = 4). Os asteriscos indicam médias estatisticamente diferentes: (*) P <0,05. (B) análise de Western blot da expressão da proteína ASR5 em plantas ASR-RNAi e plantas não-transformadas (NT).

A Figura 5 exemplifica Plantas silenciadas para ASR são sensíveis ao alumínio. (A) plantas geração T1 (ASR-RNAi) e plantas não-transformados (NT) cultivadas por 12 dias em solução contendo 450 μ M de Al. (B) diferenças no comprimento radicular das plantas RNAi e não transformadas (NT). As barras com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, P <0,05).

A Figura 6 demonstra plantas silenciadas para ASR são sensíveis à seca. Análises de conteúdo relativo de água e porcentagem de umidade em plantas geração T1 (ASR-RNAi) e não-transformados (NT) com 5 meses de

idade submetidos a estresse hídrico por 15 dias. As barras com letras diferentes são significativamente diferentes (ANOVA, $P < 0,05$).

Descrição Detalhada da Invenção

5 Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Em um aspecto, a presente invenção proporciona novas e inventivas construções gênicas, processo para modulação da expressão gênica em arroz e processo para modular a tolerância de plantas ao alumínio compreendendo, como conceito inventivo comum a modulação, em plantas, da atividade biológica de material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

Modulação da atividade biológica

15 A modulação da atividade da presente invenção compreende qualquer modificação na expressão de elementos como DNA, RNA e/ou proteínas nas células-alvo e/ou qualquer modificação no comportamento das células durante e/ou após a expressão do gene relacionado a ASR nas células-alvo, com o intuito de promover tanto a superexpressão de ASR, quanto o seu silenciamento.

Material biológico

O material biológico da presente invenção inclui, mas não se limita, a elementos como cDNA, RNAs e/ou proteínas, inteiros ou parciais, encontrados em células e/ou tecidos e/ou órgãos de um organismo eucarioto e/ou procaríoto ou obtidos sinteticamente e idênticos aos encontrados no organismo.

Construções gênicas heterólogas

As construções gênicas heterólogas da presente invenção compreendem pelo menos um material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening) juntamente com qualquer outro material biológico, fazendo com que as ditas construções sejam artificiais, diferentes daquelas encontradas na natureza.

Processo para controle quantificado da tolerância a metais em plantas

A presente invenção um processo para controle de tolerância a metais em plantas compreendendo a quantificação da modulação da atividade de material biológico relacionado ao ASR em plantas. Em uma realização preferencial, essa quantificação compreende a contagem de transcritos de material biológico relacionado a ASR em plantas.

Processo para modulação da tolerância de plantas

O processo para modulação da tolerância de plantas ao alumínio compreendendo a modulação, em plantas, da atividade biológica de material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

Em uma realização preferencial, a modulação da atividade de ASR atua de forma indireta, modulando a atividade de outros materiais biológicos presentes na planta de forma que a atuação conjunta desses materiais é responsável para proteção da planta contra metais, especialmente Al.

Plantas compreendendo construção gênica heteróloga

A presente invenção adicionalmente proporciona, a partir do uso das construções gênicas da invenção, plantas com tolerância ao Alumínio.

Exemplo 1 – Realização Preferencial

Material e métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Para o tratamento com Al, sementes de arroz ssp Japonica cv Nipponbare e de ssp Indica cv Taim foram germinadas em papel filtro por 4 dias no escuro a 28°C. As plântulas foram então cultivadas em solução hidropônica (Baier *et al.* 1995) durante 12 dias em câmara de crescimento a 28°C e 12 horas de luz. A solução hidropônica foi trocada a cada 2 dias. Após 12 dias, as plântulas foram tratadas com 150µM de AlCl₃. Amostras do tecido radicular foram coletados a 4 e 8 horas após o início do tratamento. As mesmas condições foram usadas para o experimento usando 450µM de AlCl₃. Amostras foram coletadas após 8 horas de tratamento (raízes e parte aérea foram coletadas de plantas Nipponbare, e somente raízes de plantas Taim). Para as análises de expressão da base e ápice da raiz, as plântulas foram cultivadas

nas mesmas condições descritas acima e amostras de raízes de Nipponbare foram coletadas e divididas em dois segmentos: ápice (0,5cm) e base (4cm ± 0,5cm). Como controle, foram usadas plantas crescidas nas mesmas condições não tratadas com Al. Todas as plantas foram crescidas em pH 4,5.

5 Para as análises de resposta ao estresse por frio, plântulas de 2 semanas de vida (cv Nipponbare) foram transferidas para câmara de crescimento e expostas a 4°C por 12 horas. Plantas controle foram mantidas a 28°C. Para o tratamento com luz UV, plântulas de 2 semanas de vida (cv Nipponbare) foram expostas a dois tratamentos de 4 horas de iluminação
10 continua de UV-B (0.25 kJ m⁻² min⁻¹) com 20 horas de intervalo, e então mantidas em condição normal de luz para recuperação. As análises foram realizadas 24 horas após as irradiações de luz UV-B. Para o experimento de seca, plântulas (cv Nipponbare) foram cultivadas até o estágio de 4 folhas em solo com condições normais de água. Após este estágio, plantas controle
15 foram normalmente regadas, enquanto que plantas estressadas permaneceram sem rega por 14 dias.

PCR em tempo real (RT qPCR)

Amostras dos tecidos foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e o RNA extraído usando Trizol (Invitrogen) de acordo com as
20 especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada usando a enzima transcriptase reversa M-MLV RT (Promega). A reação de transcrição reversa foi feita em um volume final de 50µl. Uma solução 1:10 do cDNA total foi preparada (solução estoque). Para as reações de RT qPCR, a solução estoque foi diluída para 1:100. O protocolo da reação de RT qPCR foi: um passo inicial
25 de 5 minutos a 94°C seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 94°C, 15 segundos a 60°C e 15 segundos a 72° C. As amostras foram mantidas por 2 minutos a 40°C para o reanelamento e então aquecidas de 55°C para 99° C para aquisição dos dados da curva de desnaturação relativa dos produtos amplificados. RT qPCRs foram realizadas utilizando 10 µL de cDNA diluído
30 (1:100), 2,0 µL de tampão de PCR 10X (Tris/HCL 100 mM, (pH 8,0), KCl 500 mM), 1,2 µL MgCl₂ 50 mM, 0,1 µL dNTPs 5 mM, 0,2 µL de cada primer 10 µM,

4,25 μ L H₂O, 2,0 μ L SYBR GREEN (1:100,000), e 0,05 μ L *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 U/ μ L; Invitrogen), em um volume final de 20 μ l. Todas as reações foram realizadas em 4 replicatas técnicas e o cálculo foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os primers utilizados foram:

5 ASR1 5'-TGGTGGACTACGACAAGGAGA-3' e 5'-GCCACCTCCTCCTTCACC-3'; ASR2 5'-CATGGCGGCTACGGCTAC-3' e 5'-GGTCCTTCTTCGCCTGGT-3'; ASR3 5'-CACCACAAGAACGACGACAA-3' e 5'-TGTGATGCTCGTGGATGG-3'; ASR4 5'-CGACTATCGCAAGGAGGAGA-3' e 5'-CGATCCCTTCCTTCATCTTG-3'; ASR5 5'-CCAGGACGAGTACGAGAGGT-3' e 5'-CGATCTCCTCCGTGATCTTG-3'; ASR6 5'-GCCCGGAGAAGTACAGGAAG-3' e 5'-GCCCTCCTCGATCCTGTG-3'. Os primers *eF α* 5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGAT-3' e 5'-GACTTCCTTCACGATTCATCGTAA-3'; *FDH* 5'-CAAATCAGCTGGTGCTTCTC-3' e 5'-TTCCAATGCATTCAAAGCTG-3' e Actin 5'-GACTCTGGTGGTGGTGCAGC-3' e 5'-GGCTGGAAGAGGACCTCAGG-3' foram usados como controles internos, para normalizar a quantidade de RNA mensageiro presente em cada amostra. Os primers STAR1 (Huang *et al.* 2009) 5'-TCGCATTGGCTCGCACCCCT-3' e 5'-TCGTCTTCTTCAGCCGCACGAT-3' foram usados como controles positivos para o estresse com Al. A quantidade dos produtos amplificados foi comparada utilizando o aparelho Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Construção dos vetores e transformação de plantas

O gene quimérico para a produção do RNA com estrutura em forma de grampo (hairpinRNA) foi construído com base na sequência do locus de ASR5 (LOC_Os11g06720.1). Os seguintes primers foram utilizados para amplificar os 417 pares de base da sequência de ASR5: 5'-CACCATGGCGGAGGAGAAGCAC-3' e 5'-TCAGCCGAAGAGGTGGTG-3'. O produto de PCR foi clonado no vetor de entrada pENTR (Invitrogen) e a seguir recombinado no vetor pANDA (Miki & Shimamoto 2004).

30 Para a localização subcelular da proteína em calos transgênicos de arroz, o cDNA completo de ASR5 foi clonado em fusão com a sequência do

cDNA do gene GFP na posição amino terminal no vetor pH7FWG2 modificado, no qual o promotor 35S foi substituído pelo promotor da ubiquitina de milho utilizando enzimas de restrição. A transformação dos calos de arroz mediado por *Agrobacterium* foi realizada de acordo com (Upadhyaya *et al.* 2000) utilizando a cv Nipponbare. Para a expressão transiente de GFP-ASR5 em protoplastos de arroz, o cDNA completo de ASR5 foi clonado em fusão com a sequência do cDNA do gene GFP na posição amino terminal no vetor Gateway pART-YFP. O isolamento de protoplastos foi realizado como descrito por Chen *et al.* (2006) e a transformação de protoplastos como descrito por Tao *et al.* (2002). Os protoplastos transformados foram incubados no escuro por 24-48 horas a 27°C previamente a visualização. A microscopia de fluorescência foi realizada no microscópio confocal a laser Olympus FluoView 1000 equipado com um conjunto de filtros capaz de distinguir entre proteínas amarelas e verdes fluorescentes (EGFP e EYFP, respectivamente) e autofluorescência de plastídios. As imagens foram capturadas no detector de alta sensibilidade photomultiplier.

Caracterização das plantas RNAi-ASR

Sementes da geração T1 e sementes de plantas não-transformadas foram germinadas em papel filtro a 28°C no escuro. Plântulas de 4 dias foram então transferidas para potes plásticos contendo solução Baier (controle) e solução Baier suplementada com 450µM de AlCl₃ (tratadas). As plântulas foram mantidas por 12 dias e o comprimento das raízes foi medido. O pH (4,5 para ambos os tratamentos) foi monitorado diariamente e a solução trocada a cada 4 dias. Para o estresse de seca, plantas da geração T1 e plantas não-transformadas foram cultivadas em solo por 5 meses com suprimento normal de água e então submetidas à seca por 15 dias. A determinação do conteúdo relativo de água (CRA) das folhas foi realizada de acordo com Cairo (1995). 20 discos foliares de 12mm de diâmetro foram coletados aleatoriamente e a massa fresca (MF1) foi determinada em balança analítica. Os discos foram então transferidos para uma placa de petri contendo água destilada e mantidos por 12 horas a temperatura ambiente e iluminação constante (40 µmol m⁻² s⁻¹).

Apos este período, os discos foliares foram removidos da placa de petri, colocados em papel filtro e submetidos à leve pressão para eliminar o excesso de água. Imediatamente, os discos foram pesados novamente (MF2). Os discos foram colocados então em sacos de papel e mantidos em câmara de ventilação a 75°C por um período de 48 horas a fim de determinar sua massa seca (MS). O CRA foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$\text{CRA (\%)} = \text{MF1-MS/MF2-MS} \times 100$$

A porcentagem de umidade dos tecidos foliares foi determinada de acordo com Slavik (1974) a partir da relação:

$$\% \text{ umidade} = \text{MF1-MS/MF1} \times 100$$

15 **Western Blot**

Plântulas de arroz não-transformadas e RNAi-ASR com 12 dias de vida foram maceradas e homogeneizadas em 0.5M Tris-HCl, pH 8.3, 2% Triton X-100, 20mM MgCl₂, 2% β-mercaptoetanol, 1mM PMSF, 2.5% PEG e 1 mM EDTA e incubadas a 4°C por 1 hora. O extrato foi centrifugado e o precipitado descartado. Amostras de 50µg de proteína foram carregadas e fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. A proteína ASR5 foi detectada utilizando anticorpo de coelho policlonal para ASR5 (1:1500). Para o preparo do anticorpo, o cDNA completo de ASR5 foi clonado em vetor pGEX e o clone recombinante foi introduzido em *E. coli* (BL21). A expressão de ASR5 foi induzida por IPTG e a proteína foi purificada com Glutathione Sepharose 4B (GE). A proteína purificada foi injetada em coelho e o soro foi usado como anticorpo. O anticorpo de cabra anti IgG de coelho (1:1000) conjugado com fosfatase alcalina foi utilizado como anticorpo secundário. As bandas foram detectadas com uma solução pré-mix de BCIP/NBT (Sigma) e reveladas em filmes de raios-X.

Análises estatísticas

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Duncan post hoc, utilizando o programa estatístico SPSS 15.0 for Windows (www.spss.com). Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

Análises in silico

As análises *in silico* foram realizadas utilizando a plataforma de microarranjo (RiceXPro) disponível em (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/index.html>) e BLAST (bl2seq) para a comparação de aminoácidos, disponível em (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>).

Resultados

Perfil de expressão de genes ASR de arroz

O padrão de expressão dos diferentes genes ASR em resposta a Al (150 μ M), usando PCR quantitativo em tempo real – RT qPCR foi analisado. Em plantas Nipponbare, uma cultivar de arroz tolerante ao excesso de Al, a expressão dos genes ASR foi regulada em resposta ao tratamento com Al (Fig. 1). Os níveis de transcritos correspondentes aos genes ASR1, ASR4 e ASR5 foram aumentados após 4 e 8 horas de tratamento, enquanto ASR2 e ASR6 mostraram um aumento no seu nível de transcritos somente após 8 horas de tratamento e ASR3 somente após 4 horas de tratamento. Quando o tratamento foi realizado com uma concentração maior de Al (450 μ M), a expressão do gene ASR5 foi ainda maior que nas plantas tratadas com 150 μ M de Al. Na parte aérea e raízes, a expressão de ASR5 aumentou quando tratadas com 450 μ M de Al por 8 horas. Em contrapartida, em raízes da cultivar Taim (*ssp Indica*), que é sensível ao Al, a expressão de ASR5 não respondeu ao tratamento com 450 μ M de Al (Fig. 2). O nível de expressão dos transcritos de ASR5 em dois segmentos da raiz (ápice e base) em Japonica (cv Nipponbare) submetidos a 450 μ M de Al são comparáveis em ambos base e ápice em plantas controle. No entanto, em resposta ao tratamento com Al, os níveis de transcritos de ASR5 aumentaram em ambos os segmentos, mas com aumento mais intenso no

apice da raiz (Fig. 3). Para confirmar o efeito do Al sobre a expressão gênica, o gene STAR1 foi utilizado como controle positivo (Huang *et al.* 2009).

Plantas silenciadas para ASR são sensíveis ao Al e a seca

Plantas transgênicas silenciadas para o gene ASR5 como alvo primário foram obtidas. A análise de expressão dessas plantas mostrou o silenciamento de ASR1 e ASR5 (Fig. 4a). Análises de western blot mostraram um decréscimo também no nível de proteína de ASR5 (Fig. 4b). Não houve diferenças entre plantas não-transformadas e RNAi quanto à altura, número de folhas e desenvolvimento de raízes em condições normais. Entretanto, as plantas transgênicas mostraram um atraso de 15 dias no florescimento, apresentaram um desenvolvimento anormal da panícula e redução no número de sementes quando comparadas as plantas não-transformadas. Além disso, as plantas transformadas apresentaram uma redução no número de tricomas em folhas, palea e lema (Fig. 4c, d). As sementes da geração T1 foram germinadas e cultivadas por 12 dias em uma solução contendo 450 µM de Al. Um aumento na susceptibilidade foi observado nas plantas T1 apresentando uma forte inibição da elongação da raiz (Fig. 5a e b). Plantas RNAi submetidas à seca por 15 dias também mostraram grande susceptibilidade a esta condição (Fig. 6). Estes resultados indicam que o silenciamento de ASR5 apresenta um efeito em plantas de arroz aumentando a sensibilidade a estresses abióticos.

Proteína ASR5 localiza-se no núcleo e citoplasma

A fim de identificar a localização subcelular da proteína ASR5 *in vivo*, o cDNA completo de ASR5 foi fusionado com GFP (Green fluorescent protein). O vetor modificado (veja material e métodos) pH7FWG2 foi utilizado para a expressão estável e o vetor pART para os ensaios de expressão transiente. Nas análises de expressão estável, calos embriogênicos de arroz transformados carregando a construção ASR5-GFP revelaram a localização nuclear e citoplasmática de ASR5 (Fig. 7).

Análises da sequência de ASR5

De acordo com nossas análises *in silico*, a sequência de aminoácidos de ASR5 de arroz e ASR1 de tomate apresentam 88% de identidade. Um sítio de

ligação ao DNA dependente de zinco descrito em ASR1 de tomate (Kalifa *et al.* 2004b) também esta presente e conservado na proteína ASR5 de arroz, com diferença em somente 2 aminoácidos. Além disso, ASR1 de tomate possui um sitio putativo de ligação a metal em sua região amino-terminal, que também
5 está presente e conservado na proteína ASR5 de arroz.

DISCUSSÃO

Os genes ASR estão bem estabelecidos como uma família relacionada à resposta a ABA, estresse abiótico incluindo déficit hídrico e salinidade, e também estão envolvidos com o processo de amadurecimento do fruto (Carrari
10 *et al.* 2004, Kalifa *et al.* 2004 e Konrad & Bar-Zvi, 2008). Neste trabalho, nos mostramos que não somente ASR5, mas a família gênica inteira é modulada aumentando seus níveis de transcritos quando plantas de arroz são submetidas a altas concentrações de Al. A proteína ASR5 foi previamente identificada como responsiva ao Al (Yang *et al.* 2007). Além do mais, análises
15 de transcriptomas comparando duas linhagens isogênicas de trigo (*Triticum aestivum* L.) contrastando no grau de tolerância ao Al revelaram um aumento nos transcritos de ASR1 em plantas estressadas com Al (Guo *et al.* 2007). Portanto, o envolvimento dos genes ASRs baseados na sua expressão em resposta ao Al é recorrente em arroz e trigo. Embora existam alguns dados na
20 literatura mostrando a resposta do gene ASR ao Al, o envolvimento direto desta classe de genes no mecanismo de tolerância ao Al ainda não foi reportado. Nesse sentido, nossos esforços comparando a acumulação dos níveis de RNA mensageiro em resposta ao Al em duas variedades de arroz com contrastante sensibilidade ao estresse por Al representam a primeira avaliação do papel
25 funcional dos genes ASR no mecanismo de defesa das plantas. Nossos resultados revelaram que o nível de expressão de ASR5 não foi afetado após o tratamento com Al na cultivar de arroz sensível Taim, enquanto que apresentou um aumento significativo na cultivar tolerante Nipponbare (Fig. 2). Corroborando com nossos resultados, a expressão do gene ASR5 foi induzida
30 na cultivar de arroz resistente a salinidade "Pokkali" em resposta ao tratamento com NaCl, mas não na cultivar sensível "IR29" (Salekdeh *et al.* 2002). Além

disso, em nossos experimentos, os níveis de RNA mensageiro aumentaram significativamente no ápice da raiz (Fig. 3). De acordo com Panda *et al.* (2009), a raiz é a região mais sensível a toxicidade ao Al. A toxicidade bloqueia a divisão celular e como resultado, o desenvolvimento da raiz é inibido (Clarkson
5 1965). O ápice da raiz e a zona de alongação são altamente sensíveis ao Al e acumulam Al facilmente. Como resultado, mais danos físicos podem ocorrer nestas zonas comparadas a regiões maduras da raiz (Panda *et al.* 2009). Em contraste a outros estresses, o tratamento com frio não afetou a expressão de ASR5. Apesar disso, é possível que ASR5 possa estar desempenhando um
10 papel de proteção nas folhas ao invés das raízes, uma vez que Kim *et al.* (2009) reportaram o aumento dos níveis de transcritos de ASR em folhas de arroz após 3 e 6 horas de frio. Além disso, a superexpressão de ASR5 aumentou a tolerância ao frio em plantas de arroz transgênicas (Kim *et al.* 2009). Também em outras plantas, a superexpressão de ASR indica um uso
15 potencial destes genes no melhoramento de plantas. A expressão estável de ASR1 de tomate em tabaco e batata aumentou a tolerância a salinidade e influenciou no metabolismo de glicose, respectivamente (Kalifa *et al.* 2004b; Frankel *et al.* 2007). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de uma ASR de lírio resultou no aumento da tolerância a salinidade (Yang *et al.* 2005).

20 Apesar de muitos estudos envolvendo os genes ASR terem sido realizados, não há relatos conhecidos da caracterização da família inteira em resposta a estresse abiótico e mais especificamente em resposta ao Al. Estes genes respondem a diferentes estresses abióticos, incluindo Al, sugerindo um papel importante na proteção da planta contra estresses ambientais da família
25 gênica ASR.

Para avaliação funcional do papel das ASRs em arroz, nós geramos plantas transgênicas silenciadas para o gene ASR5. O silenciamento foi confirmado em nível transcricional e traducional (Fig. 4a e b). Em adição, ASR1 também foi silenciado (Fig. 4a). Devido à alta homologia entre os membros da
30 família gênica ASR, é possível que a construção RNAi tenha silenciado outros membros mas, como ASR2, ASR3, ASR4 e ASR6 apresentaram 100 vezes

menos níveis de transcritos que ASR1 e ASR5 (Fig. 1), nossas análises não detectaram seus transcritos em plantas RNAi. Estes resultados sugerem que a construção RNAi foi capaz de afetar toda a família gênica ASR. As plantas ASR-RNAi apresentaram atraso no florescimento, desenvolvimento anormal da panícula e redução no número de sementes quando comparadas a plantas não-transformadas. (Fig. 4c). Além disso, plantas transgênicas apresentaram redução no número de tricomas em folhas, palea e lema (Fig. 4d)..

Tricomas podem ser importantes para diversas funções biológicas e foi demonstrado que a produção de tricomas é um caráter variável, com herança simples em várias espécies (Kárkkäinen *et al.* 2004). Além disso, a maior densidade de tricomas diminui as taxas de perda de água em várias espécies (Ehleringer & Mooney, 1978, Ehleringer, 1981, Perez-Estrada *et al.* 2000), o que poderia ajudar a explicar a suscetibilidade à seca das plantas de arroz ASR-RNAi (Fig. 6).

As plantas ASR-RNAi apresentaram aumento da susceptibilidade à exposição ao Al (Fig. 5a). O fenótipo principal foi a drástica inibição de raízes, que é o principal sintoma de fitotoxicidade ao Al (Fig. 5b). Este resultado está de acordo com o padrão de expressão observado nas plantas ASR-RNAi, sugerindo que as proteínas ASR estão funcionalmente envolvidas no mecanismo de tolerância ao Al. Além disso, essas plantas também apresentaram maior susceptibilidade à seca, apresentando conteúdo relativo de água e menor percentual de umidade quando comparado às plantas controle (Fig. 6). O envolvimento de genes ASR nas respostas ao estresse hídrico foi proposto por outros grupos (Padmanabhan *et al.* 1997, Riccardi *et al.* 1998, Sugiharto *et al.* 2002), mas nossos resultados são a primeira demonstração inequívoca da participação dessas proteínas nos mecanismos de tolerância ao stress metálico.

A maioria das proteínas ASR possuem um sinal de localização nuclear na região carboxi-terminal (Padmanabhan *et al.* 1997, Cakir *et al.* 2003, Kalifa *et al.* 2004a), composto por dois conjuntos de aminoácidos básicos conservados entre os diferentes membros de monocotiledôneas e

dicotiledôneas separados por um segmento composto por cerca de 10 aminoácidos não conservado, ou um conjunto contínuo de aminoácidos básicos (Wang *et al.*, 2005). Nas análises de expressão estável, calos embriogênicos carregando expressando a proteína ASR5 fusionada a GFP
5 revelou que a proteína ASR5 reside no núcleo e no citoplasma como previsto pela análise *in silico* (Fig. 7). Estes resultados coincidem com trabalhos precedentes que mostram que as proteínas ASR estão localizados principalmente no núcleo onde podem regular promotores específicos (Cakir *et al.* 2003, Wang *et al.* 2005; Yang *et al.* 2005).

10 Análises *in silico* revelaram algumas semelhanças entre ASR1 de tomate e a proteína ASR5 de arroz. Goldgur *et al.* (2007) mostraram que a proteína de tomate ASR1 apresenta-se como uma proteína intrinsecamente não estruturada utilizando uma série de algoritmos de previsão. A adição de íons de zinco resulta em uma mudança global na estrutura da proteína ASR1 de
15 monômero para homodímero. Após a ligação dos íons de zinco, a proteína torna-se ordenada conforme mostrado por espectrometria e microcalorimetria. Além disso, análises *in silico* mostraram que todas as proteínas codificadas pelos genes ASR de arroz possuem um domínio conservado denominado WDS (Water deficit stress) na região carboxi-terminal. A proteína ASR1 de tomate
20 apresenta uma atividade de ligação a DNA zinco-dependente, como demonstrado por Kalifa *et al.* (2004b). O sítio de ligação foi mapeado na região que compreende os aminoácidos 60-68. Dois outros sítios de ligação de zinco foram encontrados na região amino-terminal do polipeptídeo.

A sequência de aminoácidos do arroz que codifica a proteína ASR5
25 alinhada com a sequência de aminoácidos de tomate ASR1 mostrou uma identidade de 88%. O sítio de ligação a DNA zinco-dependente da ASR1 de tomate está presente e conservada na proteína ASR5 arroz, com diferença de apenas dois resíduos de aminoácidos. Além disso, ASR1 de tomate possui um sítio de ligação a metal na região amino-terminal, que também está presente e
30 conservado em ASR5 de arroz. Desta forma, o potencial de proteína ASR5 ser um fator de transcrição indica que essa proteína pode atuar através da

regulação da expressão de diferentes genes que, juntos, contribuem para a proteção da célula. Outro desafio é a identificação dos promotores alvo reconhecido pela proteína ASR. Isso nos ajudará a entender como os genes ASRs participam do mecanismo de tolerância das plantas de arroz aos níveis excessivos de Al. Além disso, nossos resultados evidenciam o potencial dos genes ASR sendo promissores para biotecnologia vegetal com o objetivo de obter plantas com maior resistência ao Al, em especial em solos ácidos.

Em conclusão: A família gênica que codifica proteínas ASR está implicada nas respostas de defesa da planta em concentrações tóxicas de alumínio. A superexpressão de ASR em plantas resulta no aumento da tolerância a esse tipo de stresse.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

CONSTRUÇÃO GÊNICA PARA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM
PLANTAS, CÉLULA TRANSFORMADA, PROCESSO PARA MODULAR A
TOLERÂNCIA A METAIS DE PLANTAS, E PROCESSO PARA CONTROLE DA
5 MODULAÇÃO DE TOLERÂNCIA A METAIS

1. Construção gênica heteróloga para modulação da tolerância de plantas ao Alumínio caracterizada por compreender pelo menos um material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening).

10 2. Construção gênica de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por compreender elementos moduladores dos genes ASR1, ASR2, ASR3, ASR4, ASR5, ASR6 e/ou combinação dos mesmos.

3. Processo para modulação da tolerância de plantas caracterizado por compreender a etapa de modular, em plantas, a atividade biológica de pelo
15 menos um material biológico relacionado aos genes ASR (Aba, stress and ripening) a fim de modular a tolerância de plantas ao Alumínio.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela modulação da atividade de material biológico relacionado aos genes ASR atuar de forma indireta na tolerância a metais em plantas.

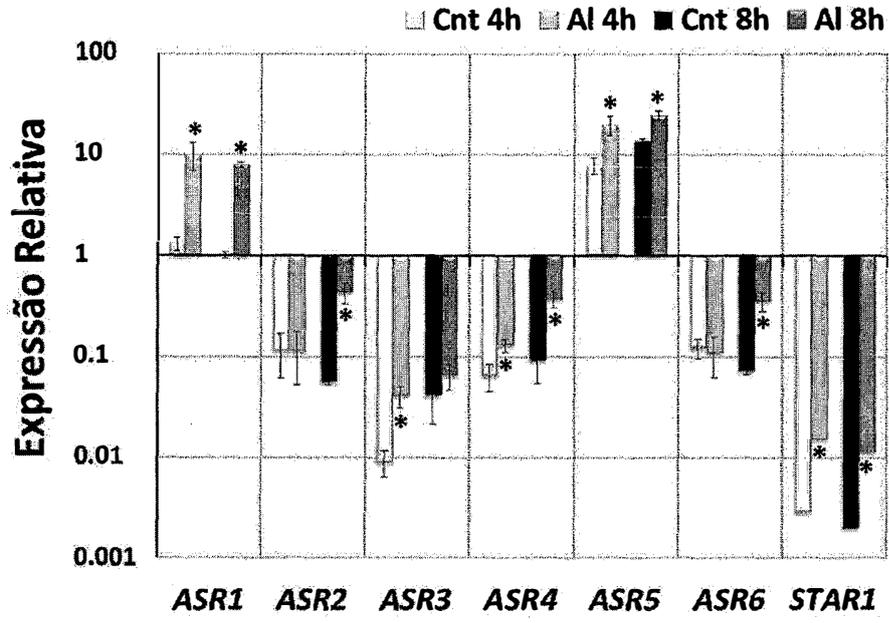
20 5. Processo de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizado por compreender a modulação de material biológico relacionado aos genes ASR1, ASR2, ASR3, ASR4, ASR5, ASR6 e/ou combinação dos mesmos.

6. Processo para controle de tolerância a metais em plantas caracterizado por compreender a quantificação da modulação da atividade de
25 material biológico relacionado ao ASR em plantas.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela quantificação compreender a contagem de transcritos de material biológico relacionado a ASR em plantas.

FIGURAS

Figura 1



5

Figura 2

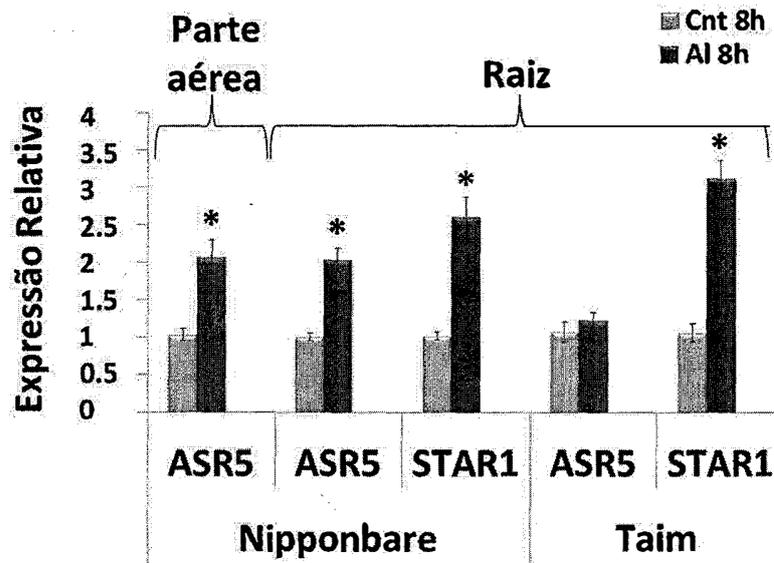
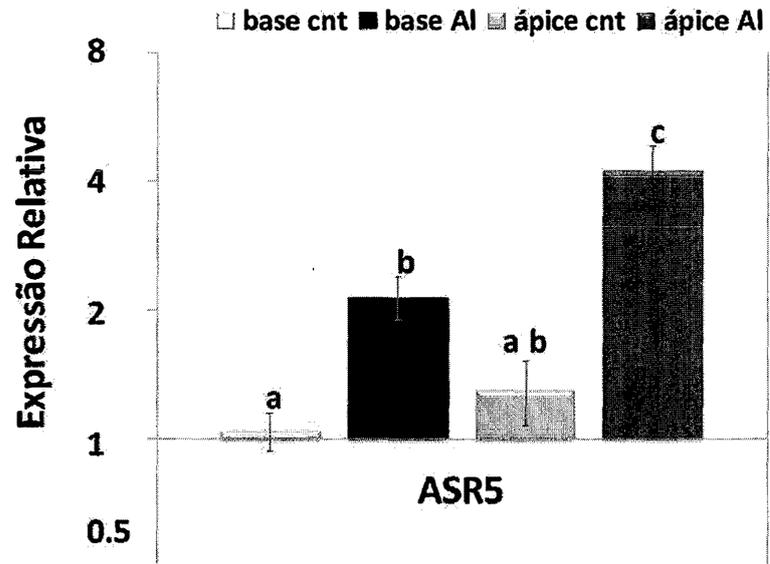


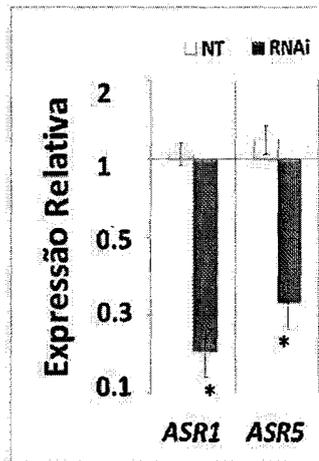
Figura 3



5

Figura 4

(a)



(b)

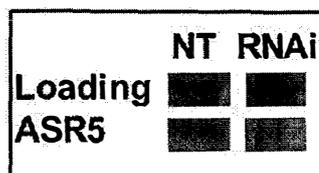
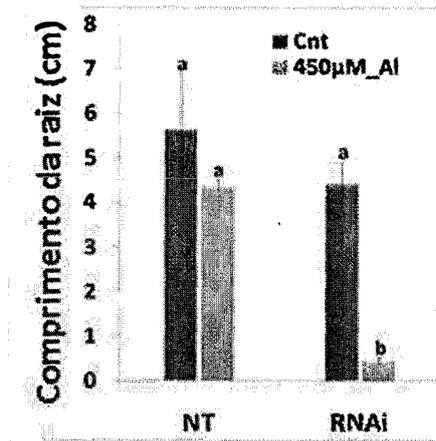
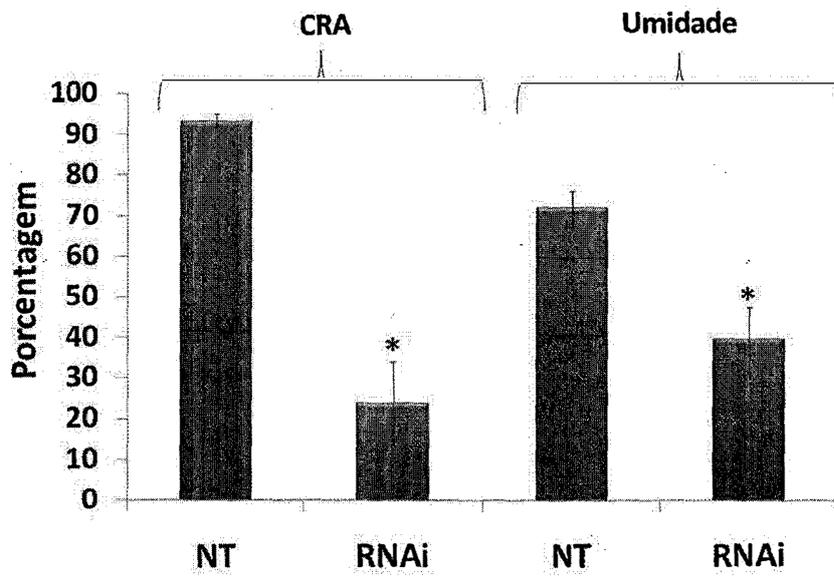


Figura 5



5

Figura 6



10

Resumo

CONSTRUÇÃO GÊNICA PARA MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA A METAIS EM
PLANTAS, CÉLULA TRANSFORMADA, PROCESSO PARA MODULAR A
5 TOLERÂNCIA A METAIS DE PLANTAS, E PROCESSO PARA CONTROLE DA
MODULAÇÃO DE TOLERÂNCIA A METAIS

A presente invenção proporciona construções gênicas, células transformadas, processos para modular a tolerância a metais em plantas,
10 processo para controle da modulação de tolerância a metais. Os objetos da invenção têm como conceito inventivo comum o uso de proteínas ASR (ABA, Stress and Ripening) de forma indireta para modular a atividade de outros materiais biológicos que contribuem para a proteção celular contra metais, especialmente contra Alumínio (Al).

15