

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

Marcelo Martins<sup>1</sup>

Marcia Pinheiro 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 isso, foram geradas 23 linhagens de *N. tabacum* superexpressando o gene, por meio de transformação de discos foliares em co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens*. Desse total, foram selecionadas duas linhagens para avaliação da tolerância aos diversos estresses. Até o presente momento, ficou comprovada a capacidade do transgene de proporcionar resistência a sal, ademais é indicado uma possível tolerância a estresse por alumínio e pH, mas novos testes devem ser realizados.

## Materiais e métodos

### Avaliação da resistência a NaCl em meio sólido

As plântulas de tabaco foram germinadas e, então, transferidas para meio MS sólido acrescido de 100 mM de NaCl, onde, semanalmente, foi mensurado o comprimento das raízes, utilizando o programa ImageJ. Os dados apresentados são relativos à média de triplicatas biológicas. A avaliação ocorreu por um período de 21 dias. Como situação controle, foram utilizadas plantas que foram transferidas para meio MS sólido idêntico ao utilizado para germinação (sem adição de sal).

### Avaliação da resistência a estresses em meio hidropônico

As plântulas de tabaco foram germinadas e, então, transferidas para o sistema hidropônico. O meio utilizado foi o MGRL, e quando houvesse a necessidade de manter o pH do meio em 4,5, foi adicionado Homo-PIPES.

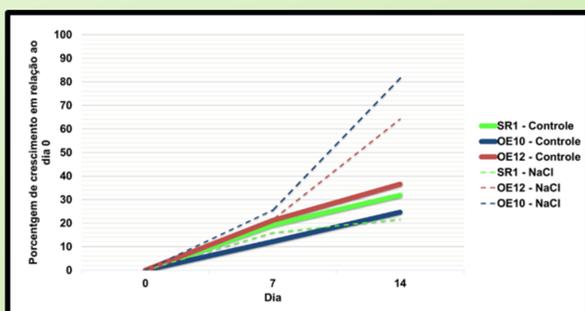
O alumínio foi adicionado a solução na concentração de 50µM. Como controle, foi utilizado o mesmo meio, porém sem a adição do agente estressante. O comprimento das raízes foi mensurado utilizando o programa ImageJ. A avaliação ocorreu por um período de 14 dias. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

### Avaliação do conteúdo de alumínio nas raízes

Para avaliar a presença de alumínio nas raízes das plantas foi feita a coloração com hidrato de morina. Brevemente, as raízes foram lavadas com acetato de amônio por 10 min, coradas com 100 µM do composto por 1 h e, então, lavadas novamente por mais 10 min. A visualização se deu por microscopia de fluorescência, observada entre 440 nm e 480 nm em um microscópio Zeiss AX10.

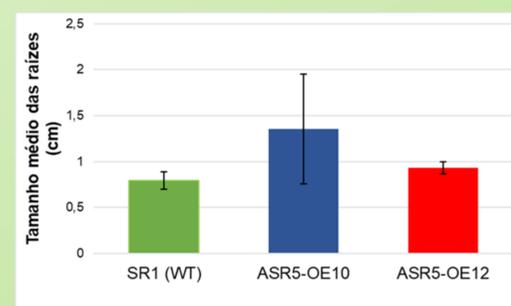
## Resultados

Os dados relacionados ao experimento de tolerância a estresse salino estão apresentados na Figura 1. Como pode ser observado, em situação estressante, as linhagens transgênicas (OE10 e OE12) comportam-se similarmente a WT. Mas, em presença de NaCl, observa-se um maior crescimento das linhagens transgênicas, junto com um decréscimo do desempenho da linhagem não transformada.

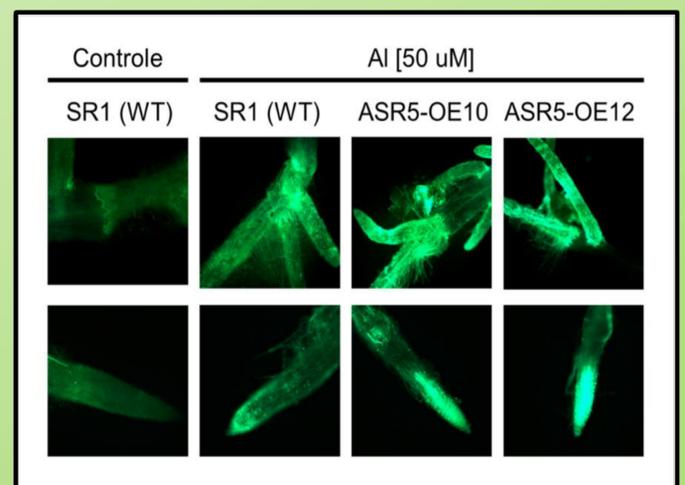


**Figura 1. Dados de crescimento radicular em meio salino.** Os números representam a porcentagem de crescimento das raízes com relação ao dia inicial.

Os resultados do teste hidropônico estão apresentados na Figura 2. Em números absolutos, o desempenho das plantas transgênicas parece indicar uma maior tolerância ao estresse. Porém, sem a presença de uma situação controle, e sem a repetição desse experimento, pode-se dizer apenas que há fortes indícios que a proteína *OsASR5* seja capaz de promover o aumento da tolerância ao estresse causado por alumínio. Pela coloração com morina das raízes submetidas a estresse por alumínio (Figura 3), pode-se indicar que, além de as transgênicas apresentarem um maior crescimento radicular, elas parecem fazer isso por um mecanismo diferente da inibição da entrada do metal na célula, porém novos testes deverão ser realizados para se ter um resultado conclusivo.



**Figura 2. Tamanho médio das raízes ao final do experimento de estresse por alumínio em meio hidropônico.**



**Figura 3. Ensaio de coloração das raízes por hidrato de morina.**

Suporte financeiro