

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia
Laboratório de Biologia Molecular Vegetal

Seqüências de DNA com Atividade Promotora em Plantas

Felipe Fenselau de Felippes

Trabalho apresentado como
Conclusão de curso para obtenção
de título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular,
Celular e Funcional

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Porto Alegre

2002

BIO
BIO
165

335244

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Giancarlo Pasquali pela orientação e amizade nesses quase dois anos de convivência.

Aos meus pais, Vitor e Ingrid, aos meus irmãos, Johann e Sofia, por todo apoio e carinho, mesmo à uma enorme distância.

A todos os meus familiares, que por mais longe que estejam, sempre me apoiaram.

Ao meu avô Herbert, que me recebeu em Porto Alegre e cujo apoio e amizade possibilitaram a realização desse curso.

À Samanta por toda a sua atenção e carinho nesses últimos dois anos.

Aos meus colegas de laboratório Adriane, Arlete, Débora, Gustavo, Heique, Maraschin, Marcelo Kern, Marcelo Zago e Philipe pela colaboração e amizade.

Ao laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética dessa Universidade, em especial à Juliana, Letícia, Raquel e Silvia, assim como à responsável por esse laboratório, Prof. Dra. Helga Winge.

A todos os colegas e funcionários do Centro de Biotecnologia.

Às Instituições Financiadoras, por possibilitarem a realização desse trabalho.

À todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

Introdução.....

1 Estrutura e Objetivos.....

1.1 A transformação.....

1.2 Ferramentas.....

1.3 Identificação.....

2 Objetivos da Pesquisa.....

3 Materiais e Métodos.....

3.1 Identificação.....

3.1.1 Matéria.....

3.1.2 Gêneros.....

3.1.3 Tipos.....

3.1.4 Classes.....

3.2 Análise.....

3.2.1 Método.....

3.2.2 Variáveis.....

3.2.3 Instrumentos.....

3.2.4 Análise.....

4 Resultados e Discussão.....

4.1 Bolsonistas.....

4.2 Avaliação.....

5 Anexo.....

6 Referências Bibliográficas.....

Esse trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), da Cia. Cervejaria Brahma, Filial Navegantes e da concessão da bolsa de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa Interno de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Sumário

1	Introdução	5
1.1	<i>Estrutura e função dos promotores</i>	6
1.2	<i>A transformação genética vegetal e o papel dos promotores</i>	10
1.3	<i>Termino da Transcrição</i>	15
1.4	<i>Transformação genética de cevada</i>	17
2	Objetivos do Presente Trabalho	19
3	Material e Métodos	20
3.1	<i>Isolamento das prováveis seqüências regulatórias</i>	20
3.1.1	Material vegetal para extração de DNA e métodos gerais de biologia molecular.....	20
3.1.2	Oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>).....	21
3.1.3	Reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR).....	22
3.1.4	Clonagem e seqüenciamento dos produtos da PCR.....	24
3.2	<i>Avaliação da atividade promotora das seqüências isoladas</i>	25
3.2.1	Material vegetal para a transformação genética.....	25
3.2.2	Vetor plasmidial de expressão.....	27
3.2.3	Transformação genética por biobalística.....	29
3.2.4	Avaliação da atividade do gene repórter <i>gusA</i>	30
4	Resultados e Discussão	31
4.1	<i>Isolamento e caracterização de prováveis seqüências promotoras de cevada</i>	31
4.2	<i>Avaliação do potencial promotor das seqüências clonadas</i>	38
5	Anexo	41
6	Referências Bibliográficas	43

1 Introdução

Os organismos superiores são compostos por um variado número de células diferenciadas, sendo cada uma especializada em uma determinada função no organismo. Esse fato pode parecer conflitante se levarmos em conta que todas as células de um organismo multicelular são derivadas de uma única célula precursora, o ovo fertilizado. Como então ocorre essa diferenciação? Em alguns poucos casos, esse processo ocorre pela perda de material genético como ocorre, por exemplo, com linfócitos B em relação à diversidade de imunoglobulinas que estas células produzem. A diferença fenotípica encontrada nos diferentes tipos celulares é causada, principalmente, pelo diferente padrão de expressão de genes que codificam proteínas. O controle da expressão gênica em organismos eucarióticos pode ser feito em diversos pontos, incluindo ativação da estrutura de cromatina, iniciação da transcrição, processamento do transcrito, transporte do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) maduro para o citoplasma, tradução do mRNA e controle pós-traducional. Entre esses diversos níveis de regulação, o principal ponto de controle da expressão gênica para a maioria dos genes conhecidos, é no início da transcrição, ou seja, a regulação da interação entre a RNA-polimerase e a seqüência promotora dos genes (Alberts *et al.*, 1997; Lewin, 2001).

Mesmo em organismos unicelulares, como as bactérias, não há, durante todo o tempo, a produção de todas as suas proteínas, sendo essa produção controlada por fatores externos. Por exemplo, as proteínas envolvidas no metabolismo da lactose só

são expressas quando essa fonte de nutriente está disponível (Alberts *et al.*, 1997; Lewin, 2001).

1.1 Estrutura e função dos promotores

Para que a transcrição tenha início, é necessário o reconhecimento da seqüência promotora do gene e a interação da RNA-polimerase com essa seqüência. Em bactérias, o reconhecimento do promotor é realizado pela própria RNA-polimerase por intermédio do fator sigma (σ). A comparação entre diferentes promotores bacterianos mostra a presença de seqüências conservadas que, provavelmente, a RNA-polimerase reconhece e a elas liga-se. Um típico promotor bacteriano apresenta quatro elementos conservados: o sítio de início da transcrição, a seqüência -10, a seqüência -35 e a região de separação entre essas duas últimas seqüências. A região -10 dos promotores bacterianos caracteriza-se por uma seqüência consenso TATAAT, conhecida como *TATAbox*. A seqüência -35 apresenta o consenso TTGACA. A primeira região é reconhecida e ligada pelo fator σ da RNA-polimerase, promovendo a abertura da dupla fita de ácido desoxirribonucléico (DNA); a segunda região é um sinal de reconhecimento e de início de transcrição para a holoenzima. Na Figura 1.1 está esquematizado um promotor típico de genes bacterianos (Lewin, 2001; Zaha, 1996).

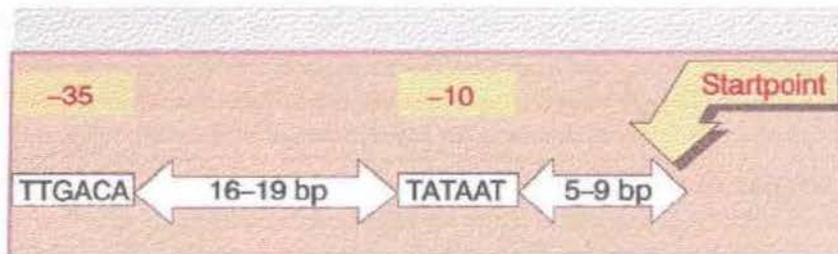


Figura 1.1: Estrutura típica de um promotor bacteriano caracterizado pela presença de duas regiões conservadas localizadas a -35 e -10 pares de bases (pb) e separadas por uma seqüência de 16-19 pb. A cerca de 5 a 9 pb a jusante da região -10 ocorre o início da transcrição, conforme indicado pela seta. Imagem extraída de Lewin (2001).

Em eucariotos, os promotores de genes transcritos pela RNA-polimerase II e, portanto, codificadores de mRNAs, localizam-se comumente a montante do gene, possuem um TATA-*box* com uma seqüência consenso de 8 pb constituída na sua totalidade de A e T. Sua seqüência consenso é muito parecida com a região promotora -10 bacteriana, apesar de sua localização ser -25 e não -10 em relação ao primeiro nucleotídeo transcrito. O TATA-*box* é a única região com uma posição relativamente fixa nos promotores eucarióticos. Além disso, promotores eucarióticos apresentam outros elementos de posição não fixa que podem ser gerais ou específicos e que são reconhecidos por proteínas especializadas capazes de impedir, promover ou modular a transcrição (fatores *trans* ou de transcrição, do inglês, *transcription factors* ou TF; Lewin 2001; Liu *et al.*, 1999; Singh, 1998).

Os eucariotos apresentam três RNA-polimerases, sendo a RNA-polimerase I responsável pela transcrição das grandes moléculas de RNA ribossômico (rRNA); a RNA polimerase II responsável pela transcrição de mRNA; e a RNA-polimerase III responsável pela transcrição das pequenas moléculas de rRNA e RNA de

transferência ou transportador (tRNA). Diferentemente da enzima bacteriana, a RNA-polimerase II não é capaz de reconhecer e de se ligar à seqüência promotora diretamente. Uma série de fatores de transcrição é responsável pelo reconhecimento de diferentes seqüências do promotor (elementos *cis*) para a formação do chamado “complexo de início de transcrição”. Para que a transcrição tenha início, é necessário o reconhecimento do TATA-*box* por essas proteínas. O complexo multiprotéico TFIID liga-se a montante do TATA-*box* por intermédio da subunidade denominada proteína ligadora do TATA-*box* (do inglês, *TATA-box binding protein* ou TBP) e de múltiplas proteínas acessórias de TBP (do inglês, *TBP accessory proteins* ou TAFs). Em seguida, outros fatores juntam-se ao complexo de início da transcrição. É somente nas etapas finais que a RNA-polimerase *per se* se torna parte do complexo e a transcrição é iniciada (Figura 1.2; Lewin 2001; Liu *et al.*, 1999; Singh, 1998).

Além dos fatores gerais, básicos de transcrição que modulam a atividade da RNA-polimerase II em células eucarióticas, diversos outros fatores de transcrição são capazes de reconhecer outros elementos *cis* do promotor possibilitando uma regulação da expressão mais específica. Esta expressão pode ser definida pelo tipo celular ou tissular onde ocorre (expressão local-específica ou espacial), do estágio do desenvolvimento do organismo (expressão momento-específica ou temporal) ou em resposta a uma série de sinais internos e externos, celulares ou ambientais (expressão sinal-responsiva). Para esses fatores de transcrição e elementos *cis* é que a atenção de um grande número de pesquisadores tem sido voltada nos últimos anos, com vistas ao entendimento da transcrição gênica em eucariotos complexos e,

também, para a modulação da expressão transgênica em organismos geneticamente modificados (Yoshida & Shinmyo, 2000; Lewin 2001; Liu *et al.*, 1999; Singh, 1998).

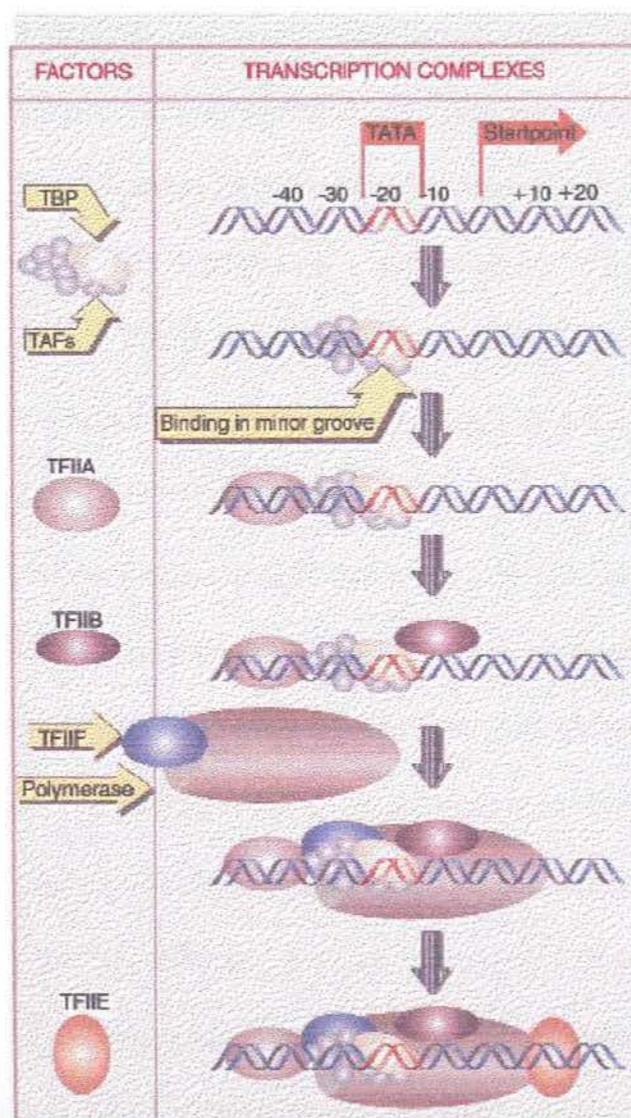


Figura 1.2: Esquema do reconhecimento das seqüências promotoras de genes eucarióticos por fatores de início da transcrição pela RNA-polimerase II. Fatores de transcrição primariamente reconhecem e ligam a seqüência promotoras. Nos últimos estágios é que a RNA-polimerase torna-se parte do complexo de iniciação de transcrição. Imagem extraída de Lewin (2001).

1.2 A transformação genética vegetal e o papel dos promotores

Desde o surgimento da agricultura, a espécie humana busca por variedades de plantas cada vez mais adaptadas aos seus interesses e necessidades. A obtenção dessas plantas tem sido realizada pelo cruzamento de indivíduos e posterior seleção da progênie, o que podemos chamar de melhoramento genético clássico. O uso dessa técnica resultou em grandes avanços na agricultura, mas apresenta certas limitações como, por exemplo, a redução do *pool* gênico, a ligação gênica, a incompatibilidade sexual e também o grande tempo necessário para se transferirem caracteres desejáveis para espécies altamente heterozigóticas, bienais ou perenes (Brasileiro & Carneiro, 1998).

Os avanços das técnicas de biologia molecular, da cultura de tecidos e o desenvolvimento das tecnologias de transferência genética em plantas possibilitaram que os genes de qualquer espécie fossem transferidos para plantas. Com isso, a transformação genética vegetal surgiu como uma importante ferramenta auxiliar para o melhoramento vegetal. A utilização dessas técnicas já resultou na obtenção de diferentes plantas com características de interesse, sendo possível citar plantas com tolerância a herbicidas (Hoshino *et al.*, 1998); plantas com resistência a patógenos como pepinos resistentes a fungos (Kishimoto *et al.*, 2001); plantas com resistência a estresse abiótico como é o caso de trigo tolerante a estresse hídrico (Sivamani *et al.*, 1999); vegetais apresentando melhor conteúdo nutricional (Takaiwa *et al.*, 1995) e plantas com o metabolismo alterado, como no caso de álamos com menores teores

de ligninas (Hu *et al.*, 1999). Exemplos de várias plantas transgênicas e transgenes foram recentemente revisados por Apse & Blumwald (2002) e Verpoort & Memelink (2002). Além de plantas transgênicas com resistência, tolerância ou melhores qualidades nutritivas ou agronômicas, a transformação genética vegetal possibilitou que as plantas fossem usadas como biorreatores, produzindo compostos que antes eram obtidos somente a partir de espécies exóticas ou em baixas quantidades, de forma econômica e renovável (revisado em Goddijn & Pen, 1995; revisado em Yoshida & Shinmyo, 2000).

Promotores afetam a expressão gênica tanto quantitativamente como qualitativamente. Por essa razão, o sucesso da aplicação da tecnologia de transferência de genes em plantas depende do uso de seqüências promotoras eficazes. Entre as seqüências de DNA com função promotora, o promotor do gene do RNA 35S do vírus do mosaico da couve-flor (do inglês, *35S Cauliflower Mosaic Virus promoter* ou CaMV 35S) desponta como o mais usado desde o início dos trabalhos de transgênese vegetal até os dias atuais (revisado em Yoshida & Shinmyo, 2000).

O promotor CaMV 35S caracteriza-se por ser um promotor forte em dicotiledôneas, capaz de promover a transcrição de mRNAs e a conseqüente expressão de proteínas em diversas plantas, embora a eficiência dependa da espécie vegetal. Porém, promotores como esse podem levar a problemas no desenvolvimento das plantas devido, por exemplo, ao acúmulo de grandes quantidades da proteína recombinante e por seqüestrar parte da maquinaria de

transcrição da célula (revisado em Yoshida & Shinmyo, 2000). Os altos níveis de expressão causados pelo uso de promotores fortes, a natureza exógena do promotor e o uso repetido da mesma seqüência também podem levar ao silenciamento gênico (revisado em Kumpatla *et al.*, 1998; revisado em Stam *et al.*, 1996). Possíveis soluções para esses problemas incluiriam a obtenção de diferentes promotores constitutivos, assim como promotores tecido-específicos e induzidos (sinal-responsivos), o direcionamento do produto do transgene para um compartimento celular específico e a transformação de organelas celulares como cloroplastos (revisado em Carrer, 1998; revisado em Heifetz, 2000).

Como comentado acima, a tecnologia de transferência de genes para plantas resultou em vegetais com os mais diversos tipos de características de interesse, sendo que, para cada caso, existe uma seqüência promotora mais apropriada, permitindo uma melhor adequação da expressão gênica e, por conseguinte, otimização do melhoramento genético. Os fortes promotores constitutivos são usados quando se necessita que uma determinada característica seja expressa em toda a planta e de maneira intensa, como no caso de plantas resistentes a um patógeno (Li *et al.*, 2000). A possibilidade do uso de plantas como verdadeiras fábricas de proteínas recombinantes, produzindo estes compostos (ou os produtos de suas atividades) em grandes quantidades, tornou bastante interessante a concentração destes em órgãos específicos. Isto permitiria uma maior eficiência na coleta e utilização dessas substâncias, reduzindo possíveis desfavorecimentos da expressão gênica constitutiva. A produção de anticorpos em sementes é um exemplo

de como a expressão tecido-específica pode ser útil, tanto para a facilidade de coleta como na conservação e estocagem da proteína recombinante (Fiedler *et al.*, 1997). Essa é uma situação típica em que o uso de promotores tecido-específicos é o mais adequado, e até mesmo essencial. Esse tipo de promotor é também recomendado quando se deseja plantas cuja função esteja concentrada em apenas um órgão, como o uso de vegetais transgênicos cujas raízes tenham alta capacidade de captação e armazenamento de substâncias tóxicas, realizando a denominada fitorremediação (Gleba *et al.*, 1999). Algumas vezes torna-se interessante que a planta transgênica expresse o transgene apenas em resposta a uma determinada situação, particularmente no caso de produção de compostos que são prejudiciais ao crescimento da planta ou em resposta ao ataque de insetos-praga ou parasitas eventuais. Para estes exemplos, o uso de promotores que podem ser induzidos é de grande valia, permitindo que a fase de crescimento seja separada da fase de produção ou que o transgene seja ativado somente na situação de a planta estar sofrendo o ataque de insetos e/ou parasitas (Suehara *et al.*, 1996). Os principais tipos de promotores induzidos são aqueles que respondem a estímulos físicos (Kuvshinov *et al.*, 2001) e químicos (revisado em Gatz, 1996; revisado em Zuo & Chua, 2000). Promotores artificiais constituem-se em outra alternativa para o controle da expressão dos transgenes. Esses promotores caracterizam-se pela combinação de elementos heterólogos e fatores *trans*-atuantes quiméricos, e são desenvolvidos para a obtenção de um bom nível de expressão e modulação dessa expressão (Wilde *et al.*, 1992).

A produção de plantas transgênicas é um assunto que vem causando polêmica tanto na comunidade científica como na comunidade leiga, sendo que uma das principais preocupações desses grupos é em relação à possibilidade de escape gênico. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para minimizar essa possibilidade e, entre elas, considera-se a utilização de promotores tecido-específico e induzíveis. Kuvshinov *et al.* (2001), por exemplo, descreveram o desenvolvimento de um cassete de expressão gênica que inclui um bloco recuperável de função do transgene. Esse bloco consiste de uma seqüência bloqueadora da transcrição, do gene de interesse e de uma seqüência de recuperação da transcrição. A atuação da seqüência de bloqueio leva à morte ou inviabilidade de desenvolvimento da planta, enquanto a seqüência de recuperação torna a seqüência bloqueadora inativa. A seqüência de recuperação é controlada por um promotor induzido por calor. Caso haja a transferência do transgene para uma planta não transgênica, essa só será viável se for submetida ao tratamento de calor específico. Este exemplo ilustra o fantástico potencial do conhecimento da função promotora de seqüências de DNA, permitindo um maior controle da expressão transgênica.

A importância dos promotores na transformação genética vegetal tem levado vários grupos a procurar seqüências mais apropriadas à regulação da expressão dos diversos transgenes de interesse (Connors *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2000). Um dos principais métodos utilizados para a avaliação da função promotora de seqüências de DNA em plantas é a fusão destas seqüências à montante de genes repórteres como o gene *gusA*, que codifica a enzima β -glicuronidase de *Escherichia coli* (GUS;

Herrera-Estrella *et al.*, 1994). A construção gênica é transferida para diferentes células, tecidos, órgãos ou vegetais inteiros pelos diferentes métodos de transformação genética e a intensidade e modo de expressão transgênica é avaliada em comparação aos devidos controles. Portanto, protocolos bem definidos de transformação genética e regeneração de plantas devem estar disponíveis para executar esta avaliação.

1.3 *Termino da Transcrição*

A terminação refere-se ao momento em que a RNA-polimerase para de acrescentar nucleotídeos à cadeia de RNA, libera a molécula sintetizada e dissocia-se do DNA molde. Esse processo requer a quebra das ligações entre o híbrido RNA-DNA e acontece quando a RNA-polimerase encontra a seqüência de um terminador. A estrutura do terminador e o ponto de terminação da transcrição é difícil de serem definidas devido a grande variabilidade e pela possível clivagem da extremidade 3' do RNA. Apesar disso, foi observado em fagos e em bactérias, que muitos terminadores requerem a formação de um grampo na estrutura secundária do RNA. Em estudos com *Escherichia coli*, os terminadores podem ser divididos em terminadores intrínsecos ou *rô*-dependentes. O primeiro não necessita de outros fatores para o término da transcrição, enquanto o segundo necessita da adição do fator *rô in vitro*. Terminadores intrínsecos possuem duas características estruturais, um grampo na estrutura secundária e uma seqüência de aproximadamente 6 uracilas na extremidade do RNA (Figura 1.3). O grampo provavelmente causa uma pausa na

transcrição enquanto a região rica em uracilas permite a dissociação da RNA-polimerase. O mecanismo de terminação em promotores ρ -dependentes ainda não é claro. Em eucariotos muito falta se conhecer sobre os fatores envolvidos na terminação, mas certas características como estrutura secundária e/ou resíduos de U são importantes. A terminação em procariotos parece ser um importante ponto de regulação da expressão (Lewin, 2001; Zaha, 1996).

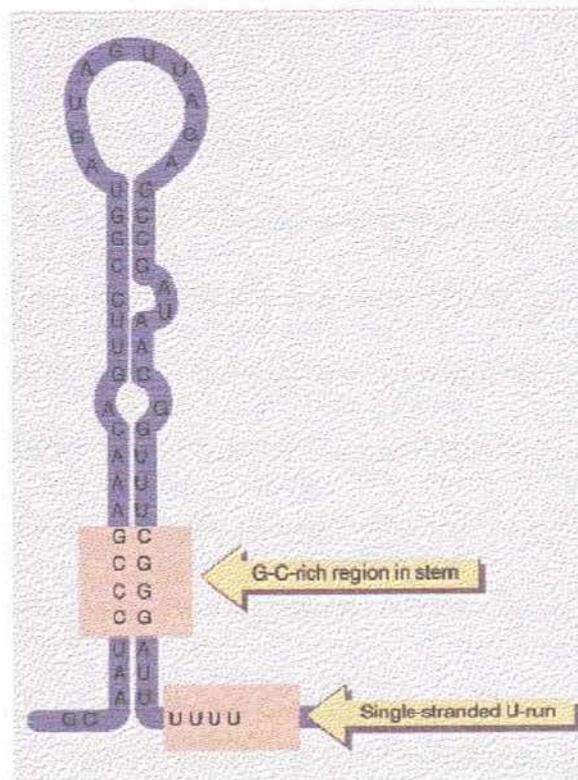


Figura 1.3: Esquema de um terminador intrínseco mostrando a presença de um grampo na estrutura secundária do RNA rico em regiões G-C seguido dos resíduos U. Imagem extraída de Lewin (2001).

Na transformação genética vegetal, o terminador/sinal de poli (A) mais comumente utilizado é derivado do gene da nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*. Seu uso tem tido sucesso tanto em mono quanto em dicotiledôneas. Apesar disso, existe indícios que terminadores oriundos de plantas podem ser mais efetivos, aumentando a expressão gênica sem alterar o padrão definido pelo promotor (revisado em Lessard et al., 2002).

1.4 Transformação genética de cevada

A cevada cultivada (*Hordeum vulgare ssp. vulgare*) é uma espécie de planta monocotiledônea anual, diplóide ($2n=14$), de autofecundação, pertencente à tribo Triticeae, da família Poaceae (Gramineae). Sua importância agrícola se reflete no fato de ser a quinta maior cultura mundial e a quarta entre os cereais, sendo cultivada em todas as regiões temperadas do mundo (Minella, 1999). A cevada é utilizada principalmente na alimentação animal e humana, na produção de malte e álcool, sendo que, no Brasil, o seu uso está restrito à produção de cerveja (Minella, 2000).

A possibilidade de obtenção de novas variedades de cevada úteis agronomicamente é bastante dificultada pelo fato desta espécie apresentar uma variabilidade genética bastante restrita, já que seus cultivares são geneticamente relacionados (revisado em Nonohay, 2002). Essa restrição torna a utilização das

técnicas de transferência genética em plantas uma ferramenta bastante promissora para a obtenção de variedades com novas características.

As primeiras plantas transgênicas de cevada foram obtidas apenas em 1994, sendo que, entre os primeiros autores, Wan & Lemaux (1994) foram os mais bem sucedidos, conseguindo a regeneração de várias plantas transgênicas férteis. Na mesma época, Jähne *et al.* (1994) conseguiram a obtenção de plantas transgênicas derivadas de micrósporos. No Brasil, o trabalho de Nonohay (2002) é o único que relata a transformação de tecidos de uma cultivar nacional de cevada pelo método de biobalística, embora plantas transgênicas não tenham sido regeneradas até o momento.

Diferentemente de outras espécies de plantas que já foram modificadas geneticamente, a obtenção de plantas transgênicas de cevada utilizando-se do promotor CaMV 35S é rara. Alguns trabalhos mostram que a expressão dirigida pelo CaMV 35S é muito inferior a de outros promotores fortes (Nonohay, 2002). Essa característica não é exclusiva de cevada, mas em monocotiledôneas em geral onde a expressão transgênica controlada pelo CaMV 35S é bastante baixa. Trabalhos com arroz e aveia exemplificam bem essa situação de baixo rendimento do CaMV 35S (Vain *et al.*, 1998; Kohli *et al.*, 1998; Cavichioli-Lamb, 2001; Irala, 2002). Para a transformação genética de plantas de cevada e a regeneração de plantas com expressão transgênica suficiente e adequada, portanto, seqüências promotoras alternativas ao CaMV 35S devem ser utilizadas.

2 Objetivos do Presente Trabalho

Em virtude da importância do cultivo da cevada para o Brasil e para o resto do mundo, da restrita variabilidade genética desta espécie, da dificuldade em se transformar essa planta e do número limitado de seqüências promotoras disponíveis para a expressão transgênica em plantas em geral, o objetivo do presente trabalho de Bacharelado foi a obtenção de novas seqüências promotoras capazes de promover a transcrição constitutiva e tecido-específica em cevada. Essas seqüências poderão ser úteis na geração de plantas transgênicas com expressão transgênica regulada não só cevada, mas como em outras plantas monocotiledôneas.

3 Material e Métodos

3.1 Isolamento das prováveis seqüências regulatórias

3.1.1 Material vegetal para extração de DNA e métodos gerais de biologia molecular

Sementes de cevada (*Hordeum vulgare vulgare*) foram germinadas sobre papéis absorventes umedecidos no interior de frascos de vidro de 15 cm de altura por 7 cm de diâmetro durante 2 dias sob total escuridão a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ (BOD). Após este período, as plântulas recém-germinadas foram mantidas durante 7 dias à temperatura e luminosidade ambientes (laboratório). A extração do DNA genômico das folhas dessas plantas de 7 dias foi realizada conforme o protocolo de Doyle & Doyle (1987). Os procedimentos de quantificação e medição de pureza do DNA extraído, assim como os protocolos de clivagem do DNA com enzimas de restrição, ligação de fragmentos a vetores plasmidiais, preparação de células competentes de *E. coli*, transformação genética de *E. coli* por choque térmico, minipreparação de DNA plasmidial, eletroforese de DNA em gel de agarose, visualização de ácidos nucleicos e preparação de meios bacteriológicos foram conduzidos de acordo com Sambrook *et al.* (1989).

3.1.2 Oligonucleotídeos sintéticos (*primers*)

Para o isolamento de possíveis seqüências regulatórias de DNA, foram selecionadas, junto ao EMBL/GenBank, quatro seqüências posicionadas a montante do início de transcrição de genes com expressão tecido-específica ou constitutiva derivadas de cevada, e uma seqüência terminadora. Estas seqüências estão abaixo identificadas:

Promotor 1 ⇒ promotor do gene da glutamil-tRNA-redutase (*hemA1*), com presumível expressão constitutiva (Nº de acesso EMBL/GenBank AF294752);

Promotor 2 ⇒ promotor do gene da glutamil-tRNA-redutase (*hemA2*), com presumível expressão constitutiva (Nº de acesso EMBL/GenBank AF294753);

Promotor 3 ⇒ promotor do gene de B193 *late embryogenic abundant proteins* (*lea*), com presumível expressão semente-específica (Nº de acesso EMBL/GenBank X81087);

Promotor 4 ⇒ promotor do gene da β -amilase, com presumível expressão constitutiva (Nº de acesso EMBL/GenBank D63574);

Terminador ⇒ terminador do gene da hordeína B1 (Nº de acesso EMBL/GenBank X03103).

Com base nas seqüências acima descritas, nove oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram sintetizados para amplificação por PCR (Tabela 3.1). Os primers HvPro1For e HvPro1Rev foram usados para a obtenção do Promotor 1, os primers HvPro2For e HvPro1Rev para o Promotor 2, HvPro3For e HvPro3Rev para o Promotor 3, HvPro4For e HvPro4Rev para o Promotor 4 e para o Terminador o conjunto HvTer1For e HvTer1Rev.

Tabela 3.1: Relação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o isolamento das prováveis seqüências promotoras e terminadora por PCR. Nome, seqüência bem como suas temperaturas médias de desnaturação (T_m) encontram-se listados acima.

Primer	Seqüência 5'-3'	T_m (°C)
HvTer1For	AAG CTT AAG AAA TCA CCG	38
HvTer1Rev	GGA TCT CGA GAA CTT GAC GGC	51
HvPro1For	GTC TGC AGT TTG GGT CG	44
HvPro1Rev	CGG CTG ACG TCG CTC CCG CCA TGG TC	64
HvPro2For	GCC TGC AGA GGA GGA	42
HvPro3For	CGT CTG CAG ATA TAC GAT TAC G	48
HvPro3Rev	CCA TGG CAC GCT GCC TGG	52
HvPro4For	CAT TGC CCG GGT GG	41
HvPro4Rev	CGT TCA CCT CCA TGG TGG	47

3.1.3 Reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR)

As PCRs foram conduzidas em um volume final de 50 μ l contendo 100 ng de DNA genômico, 200 μ M de dNTPs, 200 ng de cada *primer*, 2 U de Taq DNA-polimerase (CENBIOT Enzimas), 2 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris e água ultra-pura

(Milli-Q) autoclavada suficiente para atingir o volume final da reação. As PCRs foram feitas no termociclador Genius (Techne). As condições iniciais para amplificação foram: 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 30 segundos em uma temperatura 5°C menor que o T_m mais baixo entre o par de *primers* e 72°C por 1 min e 30 segundos, finalizando com 72°C por 1 min 30 segundos e 4°C por 5 min. Com a finalidade de se melhorar o resultados de amplificação, a temperatura de anelamento foi aumentada até se conseguir uma melhor especificidade na reação, ou seja, até se obter um único fragmento de amplificação. Quando essa abordagem alcançava o seu limite era realizado uma PCR onde a temperatura de anelamento era diminuída dois graus por três ciclos seguidos (“Touch-down PCR”). Essa nova abordagem tinha como objetivo o reconhecimento do produto de amplificação mais específico, que provavelmente seria o fragmento de interesse. Além disso, quando a reação de amplificação resultou em baixas quantidades de produto, a banda de DNA foi removida do gel com um bisturi, incubada em um tubo de microcentrifuga contendo 100 μ l de TE (Tris 10 mM, pH 8,0/EDTA 1 mM) por 24 horas a 4°C para a eluição do DNA presente no pedaço de agarose. O tubo foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para um novo tubo. Dez μ l dessa solução foram usados como DNA molde em uma nova PCR.

3.1.4 Clonagem e seqüenciamento dos produtos da PCR

Os produtos das PCRs foram purificados do gel de agarose usando os *kits* *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech) ou *CONCERT Rapid Gel Extraction System* (GIBCO) seguindo as instruções dos fabricantes. Os fragmentos purificados foram ligados ao plasmídios pUC18 clivado por *Sma*I e defosforilado usando o *kit* *Sure Clone Ligation* (Amersham Pharmacia Biotech). Os produtos das ligações foram transformados em *E. coli* XL-1 por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). As bactérias foram espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri contendo meio *Luria Broth* (LB) sólido acrescido de ampicilina ou carbenicilina a 75 mg/l, 0,1 mM de ácido isopril- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 0,02 mg/ml de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-Gal) essencialmente conforme descrito em Sambrook *et al.* (1989). As colônias brancas, presumivelmente contendo insertos, foram selecionadas e inoculadas em 1,5 mL de LB líquido contendo antibiótico e crescidas por pelo menos 16 horas sob agitação de 150 rpm para extração de plasmídeos. A confirmação da clonagem foi feita pela clivagem dos vetores plasmidiais com enzimas de restrição.

Os clones positivos foram seqüenciados por M.Sc. Deise Potrich (CBiot/UFRGS) com o *primer* -40 M13 *reverse* no seqüenciador automático *MegaBACE DNA Analysis System* (Amersham Biosciences). As seqüências resultantes foram analisadas usando o programa BLASTn disponível na página do

National Centre for Biotechnology Information
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.2 Avaliação da atividade promotora das seqüências isoladas

A caracterização da atividade promotora das seqüências isoladas foi feita pela análise da expressão transiente do gene repórter *gusA* em tecidos geneticamente transformados de cevada e arroz.

3.2.1 Material vegetal para a transformação genética

Sementes maduras de *H. vulgare* foram obtidas da Cia. Cervejaria das Américas (AmBev) a partir de estoques mantidos no Laboratório de Genética Vegetal e Cultura de Tecidos do Departamento de Genética (Instituto de Biociências, UFRGS), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Helga Winge. A assepsia superficial das sementes foi realizada pela imersão das mesmas em etanol 70% por 2 minutos, seguida da imersão em hipoclorito de sódio 6% (Mazzarolo® 8%, diluído) por 20 a 30 minutos. Por fim, as sementes de cevada foram lavadas cinco vezes com água destilada estéril.

Parte das sementes foi semeada em placas de Petri contendo “Meio de Germinação” (MG) esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos e constituídos basicamente de água e Phytoagar® (BRL) 0,75%. As placas com as

sementes foram mantidas no escuro a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 60 horas, tempo suficiente para o desenvolvimento do epicótilo. Nesse estágio, fez-se a separação entre o epicótilo, raízes e o restante da semente. O epicótilo foi então cortado longitudinalmente e posicionado no meio de placas contendo apenas MG, de maneira a expor o tecido protegido pelo coleótilo ao bombardeamento (Figura 3.1).



Figura 3.1: A) Sementes de cevada após 60 horas de germinação. B) Epicótilos separados da semente e das raízes posicionado centralmente para o bombardeamento em placa de Petri contendo MG.

Para a obtenção de calos de cevada a partir de embrião maduro, as sementes assépticas foram mantidas por 12 horas em imersão em água destilada estéril. Após esse período, retirou-se a casca e o embrião foi removido. Os embriões foram então colocados em placas de Petri contendo o meio de Murashige & Skoog (MS, 1962)

contendo sacarose 3% e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) em três diferentes concentrações: 5,5 mg/L, 7,5 mg/L e 10 mg/L. As culturas de embriões para a indução de calos foram mantidas em BOD à temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob total escuridão durante 15 dias.

Sementes de arroz (*Oryza sativa*), variedade indica, cultivar BR-IRGA 409 foram obtidas do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA). As sementes foram manualmente descascadas e imersas em etanol 70%, seguido de imersão em hipoclorito de sódio 2% (Mazzarolo® 8%, diluído) por 20 a 30 minutos e cinco lavagens seguidas com água destilada estéril.

A formação de calos em arroz foi induzida conforme descrito no protocolo definido por Irala (2002). Consiste em colocar as sementes de arroz em meio MS contendo 1% de maltose e 2,4-D a 2,5 mg/L durante 7 dias no escuro a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$. No sétimo dia, os calos foram selecionados e no oitavo dia, 4 horas antes do bombardeamento, os calos foram transferidos para meio de indução de calos contendo 0,4 M de manitol para o tratamento osmótico prévio à biobalística.

3.2.2 Vetor plasmidial de expressão

Para se confirmar a função promotora das seqüências amplificadas, os fragmentos clonados foram transferidos do vetor pUC18 para o vetor de expressão pGusXX-47 (Pasquali *et al.*, 1994). Este plasmídeo contém um sítio de

multiclonagem seguido de um promotor mínimo (seqüência TATA-*box* do promotor CaMV 35S), o gene-repórter codificador da β -glicuronidase (*gusA*) e o terminador do gene da pequena subunidade 3C da ribulose bifosfato-carboxilase (*rbcS-3C* ou rubisco) de ervilha (Figura 3.2). A transferência dos insertos foi feita por meio de enzimas de restrição escolhidas de modo a permitir o posicionamento das seqüências na orientação correta para expressão. Para que as seqüências fossem transferidas na mesma orientação encontrada no vetor de clonagem, utilizaram-se as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. Para se alterar a orientação, fez-se uso das enzimas *EcoRI* e *XbaI*.

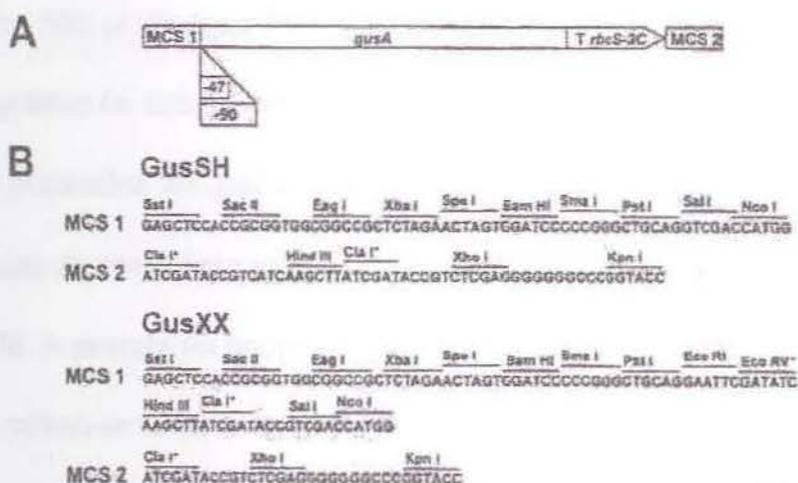


Figura 3.2: Vetores de expressão pGusSH e pGusXX. (A) Região dos vetores contendo os sítios de multiclonagem MCS1 e MCS2, flanqueando os promotores mínimos -47 e -90 do CaMV 35S, o gene *gusA* e o terminador *rbcS-3C*. (B) Detalhe dos sítios de multiclonagem MCS1 e MCS2 dos dois plasmídeos. Enzimas de restrição e seus sítios de clivagem estão indicados.

3.2.3 Transformação genética por biobalística

Os ensaios de biobalística foram realizados com um plasmídeo-controle denominado pNGI e descrito em Irala (2002). Este plasmídeo contém o gene *gusA* sobre o controle do promotor da álcool desidrogenase de milho (*adh*) e o terminador da nopalina sintase, além de uma marca de resistência à canamicina. Uma massa de 50 mg de partículas de tungstênio M10 foi esterilizada em 500 µl de etanol 70% durante 20 a 60 minutos. A solução foi centrifugada por 10 segundos a 12.000 rpm e o sobrenadante removido com o uso de micropipeta. As partículas foram então ressuspendidas em 500 µl de água bidestilada estéril. A precipitação do DNA às partículas de tungstênio foi feita em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml contendo 5 µl (1 µg/µl) do plasmídeo ao qual se acrescentou, de maneira rápida e ordenada, 25 µl das partículas de tungstênio esterilizadas, 25 µl de CaCl₂ 2,5 M e 10 µl de espermidina 0,1 M. A mistura foi homogeneizada e incubada no gelo por 5 minutos. Sem centrifugar, retirou-se 45 µl do sobrenadante.

A transformação dos tecidos de cevada foi feita com o uso de um acelerador de partículas de baixa pressão de gás hélio denominado *Particle Inflow Gun* (PIG) pertencente ao Departamento de Genética (Instituto de Biociências, UFRGS) e construído de acordo com Finer *et al.* (1992).

Para a realização do bombardeamento, a pressão de gás hélio foi ajustada para 60 psi e o material vegetal foi posicionado dentro da câmara de

bombardeamento a uma distância de 12 cm. A suspensão de partículas de tungstênio foi sonicada por 10 segundos e 2 µl foram aplicados no centro da malha do filtro-suporte que, então, foi adaptado ao bombardeador. O material vegetal foi coberto com um anteparo e se produziu vácuo no interior do equipamento até atingir a pressão de 28–29 mm de Hg, momento no qual foi efetuado o disparo. Lentamente a válvula de ar foi aberta e o material vegetal foi retirado.

Os tecidos bombardeados permaneceram nas placas por mais 48 horas em BOD escura a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e então avaliados quanto à expressão do gene repórter *gusA*.

3.2.4 Avaliação da atividade do gene repórter *gusA*

Quarenta e oito horas após os bombardeamentos, os tecidos de cevada e arroz foram submetidos ao ensaio histoquímico da enzima β-glicuronidase (GUS), produto do gene repórter *gusA*, tendo como finalidade analisar o potencial promotor das seqüências amplificadas por PCR. Os tecidos foram incubados no substrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glicuronídeo (X-Gluc) em um volume suficiente para encobrir as amostras por pelo menos 16 horas a 37°C (Herrera-Estrella *et al.*, 1994). Após o tempo de reação, os tecidos foram mantidos em etanol 70% a 4°C para retirada da clorofila e conservação do material.

4 Resultados e Discussão

4.1 Isolamento e caracterização de prováveis seqüências promotoras de cevada

Com a finalidade de isolar seqüências promotoras e terminadoras de cevada, seqüências a montante e a jusante das regiões estruturais de genes de cevada foram selecionadas junto ao EMBL/GenBank. A busca por estas seqüências foi realizada a partir do programa BLASTn disponível no sítio da internet pertencente ao *National Centre for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os termos utilizados para a busca foram “*Hordeum vulgare* and complete sequence”, e uma relação de 191 seqüências derivadas deste vegetal foram apresentadas. Desta relação, selecionamos as seguintes seqüências para a definição e síntese de oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito na Seção 3.1.2:

- genes da glutamil-tRNA-redutase (*hemA1* e *hemA2*), com presumível expressão constitutiva (Hansson, 2001);
- gene de B193 *late embryogenic abundant proteins* (*lea*), com presumível expressão semente-específica (Campalans *et al.*, 2000);
- gene da β -amilase, com presumível expressão constitutiva (Chandler *et al.*, 2001);
- gene da hordeína B1, com presumível expressão semente-específica (Davies *et al.*, 1993).

Pares de *primers* para a amplificação de seqüências promotoras (a montante da região estrutural) foram definidos a partir dos quatro primeiros genes. Um par de *primers* foi designado para a região terminadora (a jusante da região estrutural) do quinto gene listado. Esses *primers*, apresentados na Tabela 3.1, foram então usados em PCRs juntamente com DNA genômico de cevada como molécula molde. As condições das PCRs foram ajustadas, especialmente a temperatura de anelamento, até a obtenção de apenas um produto de amplificação para cada par de *primers*.

A PCR utilizando o par de *primers* sintetizados com base na seqüência do Promotor 3 (*lea*) apresentou dois fragmentos de amplificação, um de aproximadamente 500 pb (denominado P3P) e outro com aproximadamente 750 pb (denominado P3G, Figura 4.1). Tentativas de se obter apenas uma banda como produto de PCR resultaram infrutíferas. Apesar da banda maior (750 pb) ter apresentado o tamanho esperado, foi a banda de menor tamanho molecular que apresentou a maior intensidade quando se utilizou a técnica de “Touch-down PCR” (Seção 3.1.3). Por esse motivo, os dois produtos foram clonados e seqüenciados.

A PCR tendo como primers o par definido com base na seqüência terminadora (hordeína B1) resultou em apenas um fragmento de aproximadamente 350 pb, o que correspondeu ao tamanho esperado para essa seqüência (Figura 4.2).

O uso dos demais pares de primers não resultou em qualquer produto específico de amplificação, mesmo com as mais diversas variações de temperaturas e tempos em cada etapa de amplificação, ou mesmo utilizando agentes facilitadores

da PCR como dimetil-sulfoxido (DMSO) ou albumina sérica bovina (BSA), conforme recomendado no manual de instruções da enzima Pfu DNA Polymerase (STRATAGENE).

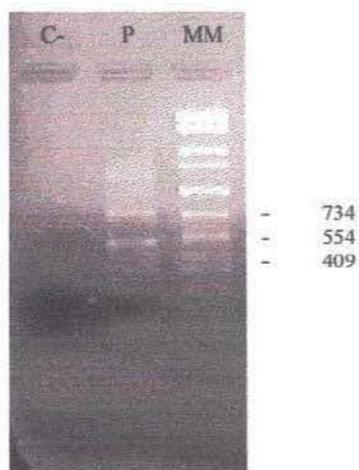


Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose a 1% representando produtos da PCR realizada com DNA genômico de cevada e *primers* específicos à seqüência do Promotor 3 (*lea*). C-, controle negativo de reação, realizada na ausência de DNA-molde; P, produtos da PCR. Um fragmento de 750 pb e outro de 500 pb são visualizados no gel; MM, marcador de tamanho de fragmentos de DNA, em pb.

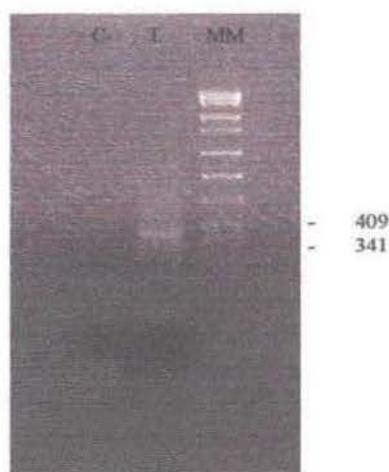


Figura 4.2: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% representando produtos da PCR realizada com DNA genômico de cevada e *primers* específicos à seqüência terminadora do gene da hordeína B1. C-, controle negativo de reação, realizada na ausência de DNA-molde; T, produto da PCR. Um fragmento de 350 bp é visualizado no gel; MM, marcador de tamanho de fragmentos de DNA, em bp.

As prováveis seqüências promotoras amplificadas pela PCR foram clonadas no vetor pUC18 e seqüenciadas automaticamente, como relatado na Seção 3.1.4. Todas as seqüências apresentaram uma boa leitura, com uma média de 600 nucleotídeos seqüenciados. Todas as seqüências foram caracterizadas com o uso do programa BLASTn.

Pelo seqüenciamento e análise da homologia, foi comprovado que o fragmento maior P3G da PCR usando os *primers* específicos ao Promotor 3 resultou, realmente, na seqüência esperada, pois esta apresentou um alto grau de identidade com a seqüência promotora do gene *lea* de cevada (Figura 4.3). Por outro lado, o fragmento menor P3P da PCR usando os *primers* específicos ao mesmo

promotor apresentou homologia com uma seqüência sem identidade presente no DNA de cevada contida em um cromossomo artificial bacteriano (BAC, Figura 4.4).

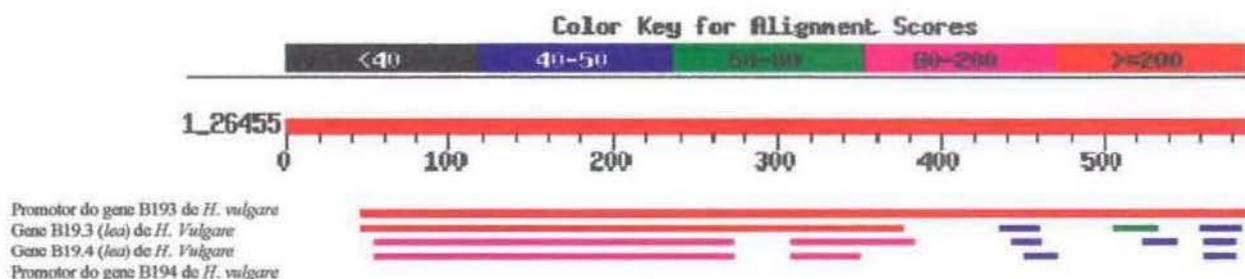


Figura 4.3: Resultado da comparação da seqüência do fragmento P3G obtido por PCR usando os *primers* desenhados para o Promotor 3, usando o programa BLASTn. O resultado confirma que o fragmento clonado é a seqüência localizada a montante do gene *lea* B193 de cevada.

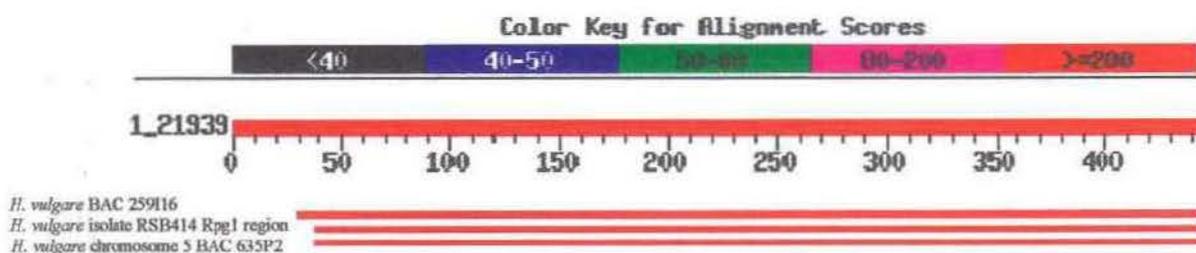


Figura 4.4: Resultado do alinhamento da seqüência clonada P3P obtida pela PCR usando os *primers* baseados na seqüência do Promotor 3 utilizando o programa BLASTn. O resultado mostra a homologia do fragmento amplificado por PCR com regiões genômicas de cevada contida em cromossomos artificiais de bactérias.

As proteínas conhecidas como *Lea* (do inglês, *late embryonic abundant proteins* ou proteínas abundantes na fase tardia do desenvolvimento embrionário) são um grupo de moléculas expressas durante os últimos estágios do desenvolvimento das sementes. Estudos mostram que a expressão dessas proteínas

pode ser induzida por ácido abscísico (ABA), pelo déficit de água, por tratamentos com excesso de cloreto de sódio (NaCl) e polietilenoglicol (PEG), sugerindo que as proteínas do grupo Lea também estariam envolvidas na defesa da planta contra o estresse hídrico, e que essa resposta poderia, em parte, ser mediada por alterações nos níveis internos de ABA (Hull *et al.*, 1996; Su *et al.*, 1998; Romo *et al.*, 2001). A análise dos promotores de genes que têm suas expressões induzidas por ácido abscísico mostra a presença de elementos responsivos a ABA (ABRE) cuja seqüência consenso é ACGTGGC (revisado em Thomas, 1993). O núcleo da seqüência consenso de ABRE é ACGT, que é reconhecido por fatores de transcrição do tipo zíper de leucinas (bZIP). A análise da seqüência parcial do fragmento amplificado P3G mostra a presença de uma seqüência do tipo TATA-*box* e a seqüência ACGTCGC, que é idêntica à seqüência ABRE, a não ser pela troca de um G por um T (Figura 4.5). Com vistas a comprovar a funcionalidade desta potencial seqüência promotora como, de fato, responsiva a ABA e estresse hídrico, plantas transgênicas contendo a mesma fusionada a genes repórteres teriam de ser submetidas aos diferentes tratamentos. A expressão da proteína repórter seria indicativo da responsividade ou não da seqüência promotora candidata.

5'-
 TGTGTGTGGACAATGAAAGAGAGAAGACACGACTGTTTCAGGATTA AACAC
 ATCCTAGATTAATCTACTAATTAATTTCTAACATACTACACACATGTC
 GTACGTCCCTCCATAGCCCAGAGTAACAGTCTCCAGAGCCTTGATGTC
 CATGCCCCGCAGTCTCCGAGCAGCCGCCGACCACCCGAGCACGGTGAGTG
 CTAGCTAGAACCATGATCCTGGCTACGTGTCCACTCGTGGACAGCACAAG
 ACAACGCACGAGTCGCTAGCATTGGCAGCTCAATATCCGCTTCCTCGGAC
 AACCGTGCACACTCATTCCGGTGCCCATGCAAGTTACCACGTGTCGCCCAA
 CCAGAGGCTTGATGCACGACACGTCTTAGACTCTTGATACAGCAGGAGC
 GCGGAGAGGTACACGCGCCGGCTCCTAGCGCGCCAAGCTCCTCCTTGTCG
 GCTATATAAACGCGACGTCGCTAGCTCCTCCGCCATCAGCATCAGGCAAT
 CACAGAGCACCAGAGCAGTCGCATACC AACCCTAAGTCGGCTACGTTTC
 CGTAGTAGTCCAGCAGCGTACCTGGGTACCGAGCTGATT - 3'

Figura 4.5: Sequência parcial do fragmento clonado P3G. Em azul, região correspondente ao braço do vetor de clonagem. Em rosa, sequência do *primer* reverso usado na PCR. Em marrom, região do TATA-*box*. Em verde, possível elemento responsivo a ABA, sendo que as letras em laranja representam as bases discordantes.

O seqüenciamento do produto da PCR do terminador revelou que o fragmento amplificado tinha alto grau de identidade com vetores de clonagem (Figura 4.6). Devido a esse resultado, não foram conduzidos os experimentos necessários para a confirmação da função de terminador dessa seqüência, mas apenas os experimentos para analisar o seu potencial como promotor.



Figura 4.6: Representação gráfica de alinhamentos da seqüência amplificada por PCR com *primers* específicos à região terminadora do gene da hordeína B3 de cevada utilizando o programa BLASTn. O resultado mostra homologia do fragmento clonado com diversos vetores de DNA.

4.2 Avaliação do potencial promotor das seqüências clonadas

Para proceder a análise das potenciais seqüências promotoras isoladas por PCR, todos os fragmentos clonados em pUC18 foram transferidos para o vetor de expressão pGusXX-47 (Pasquali *et al.*, 1994), desenvolvido especialmente para o teste de seqüências promotoras (ver Seção 3.2.2). A transferência dos fragmentos foi realizada por meio do uso de enzimas de restrição que proporcionassem o posicionamento dos insertos na orientação correta (direta) e inversa para a expressão. Essas construções serão usadas no bombardeamento de calos de arroz e diferentes tecidos de cevada uma vez confirmada a eficiência de transformação e expressão transitória pelo método da biobalística.

A transformação genética de cevada é realizada principalmente usando tecidos derivados de embriões imaturos (ver Seção 1.4). A obtenção de embriões imaturos depende do acesso a espigas imaturas de cevada e o único material

disponível para a realização do bombardeamento no período de obtenção destes resultados eram sementes maduras. Por isso, tecidos derivados dessas sementes foram transformados com o vetor-controle pNGI (Seção 3.2.3), e a expressão transiente do gene *gusA* foi analisada histoquimicamente. Os dois tecidos de cevada que foram testados para a futura análise dos possíveis promotores foram calos de embriões maduros e epicótilos de 2 dias (Seção 3.2.1).

A tentativa de obtenção de calos a partir de embriões maduros foi infrutífera. O embrião manteve seu padrão de germinação mesmo com as altas doses de auxina (2,4-D) utilizadas. Esse resultado pareceu inesperado, já que Nonohay (1996) obteve calos de cevada originados de embriões imaturos usando uma concentração de auxina igual à concentração mais baixa usada neste trabalho.

Epicótilos foram testados devido à condição jovem desses tecidos (ver Seção 3.2.1). O bombardeamento desse tecido não resultou na expressão detectável da enzima GUS. A falha na tentativa de transformação transiente de epicótilos de cevada pode ter sido devido à falta de otimização das condições do bombardeamento.

Devido à falta de tecidos de cevada apropriados, a análise das seqüências isoladas foi realizada utilizando calos de arroz. O arroz foi escolhido pois se trata de uma monocotiledônea, assim como a cevada, e principalmente pelo fato dos protocolos de cultura de tecido e transformação genética transitória estarem bem estabelecidos no laboratório, graças ao trabalho de Irala (2002). Para se testar a efetividade da transformação genética transitória de arroz por biobalística de baixa

pressão, 30 calos foram bombardeados com o plasmídeo pNGI (ver Seção 3.2.3). Destes, apenas 8 apresentaram expressão da enzima GUS, sendo uma média de 3,5 pontos por calo, resultado considerado insatisfatório para a realização do teste das seqüências promotoras. Esse resultado pode ter sido causado pela falta de otimização das condições de bombardeamento de calos de arroz à baixa pressão.

O presente trabalho de Bacharelado teve como objetivo o isolamento de seqüências promotoras de cevada com expressão constitutiva ou tecido-específica. Utilizando a PCR foram obtidas três seqüências, sendo uma delas, uma provável seqüência promotora tecido-específica e induzível. A partir do momento que tecidos de cevada derivados de embriões imaturos estiverem disponíveis, será realizada a análise da possível função promotora dos fragmentos isolados.

5 Anexo

O presente trabalho de bacharelado utilizou, além dos três fragmentos amplificados pela PCR (Seção 4.1), três outros fragmentos que não alinharam com nenhuma outra seqüência depositada no banco de dados. Essas seqüências foram obtidas por Maraschin (2002), e refere-se aos fragmentos *str* A2, A3 e B, amplificados por PCR, tendo como objetivo o isolamento do gene da strictosidina sintase (*str*), uma das enzimas chave na síntese de alcalóides indólicos terpênicos. Esses fragmentos encontravam-se clonados no vetor pCR[®] Blunt (Invitrogen) e suas seqüências são apresentadas na figura 5.1.

Essas três seqüências foram transferidas para o vetor de expressão pGusXX-47 (ver Seção 3.2.2) utilizando-se a enzima de restrição *EcoRI* e, juntamente com os fragmentos isolados no presente trabalho, terão a sua capacidade promotora testada como descrito na Seção 3.2.3.

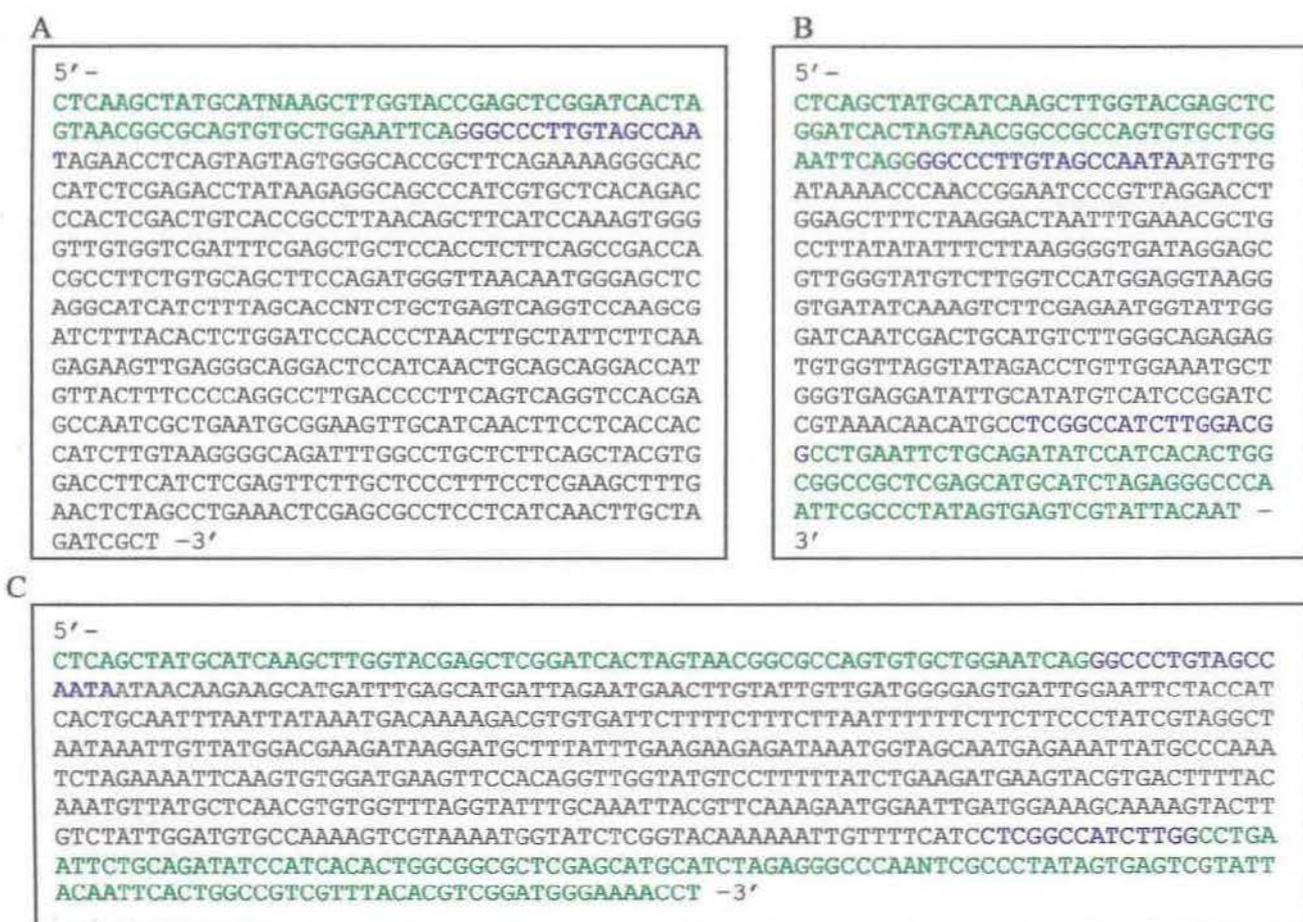


Figura 5.1: Estão representadas nessa figura as seqüências dos fragmentos amplificados por Maraschin (2002), clonadas no plasmídeo pCR Blunt e que não alinham com nenhuma seqüência do banco de dados. A) Seqüência do fragmento *str* A2. B) Seqüência do fragmento *str* A3. C) Seqüência do fragmento *str* B. **Em verde**, região correspondente ao braço do vetor de clonagem; **em azul**, região correspondente aos *primers* utilizados.

6 Referências Bibliográficas

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. 1997. **Biologia molecular da célula**. Artes Médicas, Porto Alegre: p. 1294.

APSE, M. P.; BLUMWALD, E. 2002. **Engineering salt tolerance in plants**. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 146-150.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. 1998. **Introdução à transformação genética em plantas**. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C., eds. *Manual de transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-cenargen: 13-16.

CAMPALANS, A.; PAGÈS, M.; MESSEGUER, R. 2000. **Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein**. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 449-457.

CARRER, H. 1998. **Transformação de cloroplastos**. *Biotecnologia ciência & tecnologia*, 5: 52-55.

CAVICHIOLO-LAMB, C. R. 2001. **Regeneração de plantas a partir de segmentos de base de folhas em aveia**. *Ciência Rural*, 31: 751-755.

CHANDLER, J. W.; APEL, K.; MELZER, S. 2001. **A novel putative β -amylase gene and *AT β -Amy* from *Arabidopsis thaliana* are circadian regulated**. *Plant Science*, 161: 1019-1024.

CONNORS, B. J.; MILLER, M.; MAYNARD, C. A.; POWELL, W. A. 2002. **Cloning and characterization of promoters from American chestnut capable of directing reporter gene expression in transgenic *Arabidopsis* plants**. *Plant Science*, Article in press: 1-11.

DAVIES, J. T.; SHEWRY, P. R.; HARRIS, N. 1993. **Spatial and temporal patterns of B hordein synthesis in developing barley (*Hordeum vulgare* L.) caryopses**. *Cell Biology International*, 17: 195-203.

DOYLE, J.; DOYLE, L. 1987. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

FIEDLER, U.; PHILLIPS, J.; ARTSAENKO, O.; CONRAD, U. 1997. **Optimization of scFv antibody production in transgenic plant.** *Immunotechnology*, 3: 205-216.

FINER, J. J.; VAIN, P.; JONES, M. W.; MCMULLEN, M. D. 1992. **Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells.** *Plant Cell reports*, 11: 323-328.

GATZ, C. 1996. **Chemically inducible promoters in transgenic plants.** *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 168-172.

GLEBA, D.; BORISJUK, N. V.; BORISJUK, L. G.; KNEER, R.; POULEV, A.; SKARZHINSKAYA, M.; DUSHENKOV, S.; LOGENDRA, S.; GLEBA, Y. Y.; RASKIN, I. 1999. **Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 5973-5977.

GODDIJN, O. J. M.; PEN, J. 1995. **Manipulating metabolism: Plants as bioreactors.** *Trades in biotechnology*, 13: 379-387.

HANSSON, M. 2001. **Basic characterization of two barley *HemA* promoter regions reveal stem-loop structure and suggest a regulatory role in *Poaceae* tetrapyrrole biosynthesis.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 39: 155-160.

HEIFETZ, P. B. 2000. **Genetic engineering of the chloroplast.** *Biochimie*, 82: 655-666.

HERRERA-ESTRELA, L.; LEÓN, P.; OLSSON, O.; TEERI, T. H. 1994. **Reporter genes for plants.** In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (eds). *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: C2, 1-32.

HOSHINO, Y.; TÜRKAN, I.; MII, M. 1998. **Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhisogenes* transformation.** *Scientia Horticulturae*, 76: 37-57.

HU, W.; HARDING, S. A.; LUNG, J.; POPKO, J. L.; RALPH, J.; STOKKE, D. D.; TSAI, C.; CHIANG, V. L. 1999. **Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees.** *Nature Biotechnology*, 17: 808-812.

HULL, G. A.; GARRIDO, J. M. G.; PARCY, F.; MENOSSI, M.; MARTINEZ-IZQUIERDO, J. A.; GALLOIS, P. 1996. **Use of the *lacZ* reporter gene as an**

internal control of GUS activity in microprojectile bombarded plant tissue. *Plant Science*, 120: 153-160.

IRALA, P. B. 2002. **Transformação genética de *Oryza sativa* subespécie indica cultivar BR-IRGA 409.** UFRGS, Porto Alegre: p. 107. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JÄHNE, A.; BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LÖRZ, H. 1994. **Regeneration of transgenic, microspore-derived, fertile barley.** *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 525-533.

KISHIMOTO, K.; NISHIZAWA, Y.; TABEL, Y.; HIBI, T.; NAKAJIMA, M.; AKUTSU, A. 2001. **Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*).** *Plant science*, 162: 655-662

KOHLI, A.; LEECH, M.; VAIN, P.; LAURIE, D. A.; CHRISTOU, P. 1998. **Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot-spots.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 7203-7208.

KUMPATLA, S. P.; CHANDRASEKHARAN, M. B.; IYER, L. M.; LI, G.; HALL, T. C. 1998. **Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing.** *Trends in plant science*, 3: 97- 104.

KUVSHINOV, V.; KOIVU, K.; KANERVA, A.; PEHU, E. 2001. **Molecular control of transgene escape from genetically modified plants.** *Plant Science*, 160: 517-522.

LESSARD, P. A.; KULAVEERRASINGAM, H.; YORK, G. M.; STRONG, A.; SINSKEY, A. J. 2002. **Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants.** *Metabolic Engineering*, 4: 67-79.

LEWIN, B. 2001. **Genes VII.** Artes Médicas, Porto Alegre: p. 955.

LI, Z.; JAYASANKAR, S.; GRAY, D. J. 2000. **Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*).** *Plant Science*, 160: 877-887.

LIU, L.; WHITE, M. J.; MACRAE, T. H. 1999. **Transcription factors and their genes in higher plants. Functional domains, evolution and regulation.** European Journal of Biochemistry, 262: 247-257.

MARASCHIN, F. S. 2002. **Isolamento de genes envolvidos na biossíntese de alcalóides e transformação genética de *Psychotria brachyceras*.** UFRGS, Porto Alegre: p. 50. Trabalho de Conclusão, Curso de Ciências Biológicas, ênfase Molecular, Celular e Funcional, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MINELLA, E. 1999. **Melhoramento de Cevada.** In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** UFV, Viçosa: 252-272.

MINELLA, E. 2000. **Safra Brasileira de cevada de 1999.** Anais da XX Reunião de Pesquisa de Cevada. Embrapa Trigo, Passo Fundo: p. 420.

MURASHIGE, R.; SKOOG, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** Physiologia Plantarum, 15: 473-497.

NONOHAY, J. S. 1996. **Embriogênese somática e regeneração de plantas férteis em cultivares brasileiras de cevada, *Hordeum vulgare vulgare*, Poaceae.** UFRGS, Porto Alegre: p. 87. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NONOHAY, J. S. 2002. **Genética, cultura de tecidos e transferência de DNA em plantas: Gênero *Hordeum*.** UFRGS, Porto Alegre: p. 138. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PASQUALI, G.; OUWERKERK, P. B. F.; MEMELINK, J. 1994. **Versatile transformation vectors to assay the promoter activity of DNA elements in plants.** Gene, 149: 373-374.

ROMO, S.; LABRADOR, E.; DOPICO, B. 2001. **Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants.** Plant Physiology and Biochemistry, 39: 1017-1026.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York. 3v.

SINGH, K. B. 1998. **Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control.** Plant Physiology, 118: 1111-1120.

SIVAMANI, E.; BAHIELDIN, A.; WRAITH, J. M.; AL-NIEMI, T.; DYER, W. E.; HO, T. D.; QU, R. 1999. **Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA 1* gene.** *Plant science*, 155: 1-9.

STAM, M.; MOL, J. N. M.; KOOTER, J. M. 1996. **The silence of genes in transgenic plants.** *Annals of botany*, 79: 3-12.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T. D.; WU, R. 1998. **Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants.** *Plant Physiology*, 117: 913-922.

SUEHARA, K.; TAKAO, S.; NAKAMURA, K.; UOZUMI, N.; KOBAYASHI, T. 1996. **Optimal expression of GUS gene from methyl jasmonate-inducible promoter in high density culture of transformed tobacco cell line BY-2.** *Journal of bioscience and bioengineering*, 82: 51-55.

TAKAIWA, F.; KATSUBE, T.; KITAGAWA, S.; HISAGO, T.; KITO, M.; UTSUMI, S. 1995. **High level accumulation of soybean glycinin in vacuole-derived protein bodies in the endosperm tissue of transgenic tobacco seed.** *Plant Science*, 111: 39-49.

THOMAS, T. L. 1993. **Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview.** *The Plant Cell*, 5: 1401-1410.

VAIN, P.; WORLAND, B.; CLARKE, M. C.; RICHARD, G.; BEAVIS, M.; LIU, H.; KOHLI, A.; LEECH, M.; SNAPE, J.; CHRISTOU, P.; ATKINSON, H. 1998. **Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (*Oryzacystatin-IAD86*) for nematode resistance in transgenic rice plant.** *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 266-271.

VERPOORT, R.; MEMELINK, J. 2002. **Engineering secondary metabolite production in plants.** *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 181-187.

WAN, Y.; LEMAUX, P. G. 1994. **Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants.** *Plant Physiology*, 104: 37-48.

WILDE, R. J.; SHUFFLEBOTTOM, D.; COOKE, S.; JASINSKA, I.; MERRYWEATHER, A.; BERI, R.; BRAMMAR, W. J.; BEVAN, M.; SCHUCH, W. 1992. **Control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator-repressor system.** *The EMBO Journal*, 11: 1251-1259.

WU, S.; DRUKA, A.; HORVATH, H.; KLEINHOF, A.; KANNAGARA, C. G.; WETTSTEIN, D. 2000. **Functional characterization of seed coat-specific members of the barley germin gene family.** *Plant Physiology and Biochemistry*, 38: 685-698.

YOSHIDA, K.; SHINMYO, A. 2000. **Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor.** *Journal of bioscience and bioengineering*, 90: 353-362.

ZAHA, A. (Ed). 1996. **Biologia molecular básica.** Mercado Aberto, Porto Alegre: p. 337.

ZUO, J.; CHUA, N. 2000. **Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes.** *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 146-151.