

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE FUSÃO GÊNICA VISANDO
À LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PLANTAS

Ricardo Gargaro de Souza
Biólogo/UNESC

Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Fitossanidade

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2006

Aos meus pais, Roberto Barbosa de Souza e Célia Maria Gargaro de Souza, verdadeiros mestres nas ciências da dignidade e ternura. Pessoas que, do alto da sua nobreza e simplicidade, legaram-me a herança mais preciosa - seu amor - transcrito em palavras e exemplos, os quais busco traduzir em ações, nos meus pequenos feitos de cada dia.

À minha jóia mais preciosa, Laís Gargaro de Souza, que, ao longo deste trabalho, mostrou maturidade sabendo abrir mão da atenção do pai, mesmo em momentos delicados da sua tenra existência.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Luís Alexandre Campos, Isabel Alves dos Santos, Jairo José Zocche, Mári Stela Campos, Vanilde Citadini Zanete e Zenaide Pais Topanotti, da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, pelo apoio e incentivo, fundamentais desde o início deste trabalho;

Aos professores do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da UFRGS, pelo convívio e por seus preciosos ensinamentos;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia molecular, Doutorandas Adriana Corrent e Caren Cavichioli Lamb, Mestrandos Flávia Vanina Ferreira, Marcos Vinícius de Souza e Sandra Maria de Souza, amigos e profissionais de valor inestimável;

Aos bolsistas de iniciação científica Alex da Silva Corrêa, Elisângela Aquino de Souza, Jeferson Mateus Dariva, Johannes Humbertus Falcade e Mônica da Silva Medeiros, por todo o auxílio e convivência prazerosa.

À secretária do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Sra. Marisa Carvalho Bello, profissional dedicada e amiga.

Aos funcionários do Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Departamento de Fitossanidade, em especial, Marisa, Miguel, Tony, e Valmor.

À amiga Grasiela Agnes, pelos momentos de confraternização e descontração junto ao grupo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, pelo ensino gratuito e da mais alta qualidade, modelo em serviço público e motivo de orgulho da minha terra gaúcha.

Ao Prof. Dr. Marcelo Gravina de Moraes, exemplo de integridade e dedicação, a quem tenho profundo respeito e gratidão pela orientação, compreensão e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudos que viabilizou a realização deste trabalho.

DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA DE FUSÃO GÊNICA VISANDO À LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM PLANTAS^{1/}

Autor: Ricardo Gargaro de Souza
Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Uma significativa quantidade de proteínas vegetais apresenta-se compartimentalizada nas diversas estruturas celulares. A sua localização pode conduzir à elucidação do funcionamento dos processos biossintéticos e catabólicos e auxiliar na identificação de genes importantes. A fim de localizar produtos gênicos relacionados à resistência, foi utilizada a fusão de cDNAs de arroz (*Oryza sativa* L.) ao gene da proteína verde fluorescente (GFP). Os cDNAs foram obtidos a partir de uma biblioteca supressiva subtrativa de genes de arroz durante uma interação incompatível com o fungo *Magnaporthe grisea*. Estes cDNAs foram fusionados a uma versão intensificada de *gfp* e usados para transformar 500 plantas de *Arabidopsis thaliana*. Outras 50 plantas foram transformadas com o mesmo vetor, porém sem a fusão (vetor vazio). Foram obtidas aproximadamente 25.500 sementes oriundas das plantas transformadas com as fusões EGFP::cDNAs e 35.000 sementes das transformadas com o vetor vazio, produzindo, respectivamente, 750 e 800 plantas tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio. Após a seleção, segmentos foliares das plantas foram analisados por microscopia de fluorescência, visando o estabelecimento do padrão de localização de EGFP. Foram observadas 18 plantas transformadas com a fusão EGFP::cDNAs e 16 plantas transformadas com o vetor vazio apresentando expressão detectável de GFP. Uma planta transformada com uma fusão EGFP::cDNA apresentou localização diferenciada da fluorescência, notadamente nas células guarda dos estômatos e nos tricomas. Após seqüenciamento do cDNA fusionado, foi verificado que esta planta apresentava uma inserção similar a uma seqüência codificante de uma quinase, uma classe de enzimas envolvidas na transdução de sinais em resposta à infecção por patógenos.

^{1/}Dissertação de Mestrado em Fitotecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (58 p.) Março, 2006.

DEVELOPMENT OF A GENE FUSION STRATEGY IN PLANTS TO LOCATE PROTEINS IN PLANTS¹

Author: Ricardo Gargaro de Souza
Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

A significant amount of plant proteins is compartmentalized in different cellular structures. The location of such proteins is essential to understand the function of biosynthetic and catabolic processes and also to help the identification of important genes. To identify the location of gene products related to resistance, rice (*Oryza sativa*) cDNAs were fused to a gene coding a GFP protein (green fluorescent protein). The cDNAs were obtained from a suppressive subtractive library of rice plants during an incompatible interaction with *Magnaporthe grisea* fungus. The cDNAs were fused to an enhanced version of *gfp* and they were used to transform 500 *Arabidopsis thaliana* plants, yielding 25.500 T1 seeds. Other 50 plants were transformed with the same vector, but without the EGFP::cDNA fusion (empty vector), yielding 35.000 T1 seeds. Seven hundred and fifty and 800 plants were generated from T1 seeds of the EGFP::cDNA fusions and empty vector transformations, respectively. Following herbicide selection, detached leaves were analyzed under a fluorescence microscope to evaluate the pattern of EGFP localization. It was observed that 18 plants transformed with EGFP:cDNA fusion and 16 plants transformed with empty vector showed detectable EGFP accumulation. One plant transformed with EGFP::cDNA showed a unique localization of the fluorescent signal. In this plant, the EGFP expression was predominantly visible at the stomata guard cells and trichomes. After, cDNA sequencing, the cDNA from this plant has shown insert similarity to kinase protein sequence, an enzyme class frequently related to signal transduction in response to pathogenic infections.

¹Master of Science dissertation in Agronomy. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (58 p.) March, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O arroz	4
2.1.1 A importância do arroz.....	4
2.2 Genômica	5
2.2.1 A genômica estrutural do arroz.....	5
2.2.2 O arroz como modelo genômico.....	5
2.2.3 O seqüenciamento genômico do arroz	6
2.2.4 Genômica funcional	8
2.3 Fusão de proteínas em estudos de localização.....	8
2.4 O endereçamento polipeptídico em nível subcelular	10
2.5 As proteínas autofluorescentes	11
2.5.1 A proteína verde fluorescente	11
2.5.2 GFP em plantas.....	13
2.6 Transformação genética de plantas	15
2.6.1 Transformação via <i>A. tumefaciens</i>	15
2.7 <i>A. thaliana</i> como planta modelo em transformações genéticas	16
2.7.1 Transformação floral	17
2.8 Visualização de estruturas celulares através de GFP	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Material vegetal	21
3.2 Transformação de <i>A. thaliana</i>	21
3.3 Análises fenotípicas.....	22
3.3.1 Seleção de plantas transformadas de <i>A. thaliana</i>	22
3.3.2 Microscopia de epifluorescência	23
3.4 Biblioteca de cDNAs	24
3.5 Digestão dos cDNAs	25
3.6 Digestão e desfosforilação do vetor pEGAD	26
3.7 Reação de ligação dos cDNAs ao vetor pEGAD	28
3.8 Transformação genética de <i>A. tumefaciens</i>	28
3.9 Identificação de colônias de <i>A. tumefaciens</i> contendo plasmídeos recombinantes.....	29
3.10 Preparo das culturas de <i>A. tumefaciens</i> para transformação de plantas.....	31
3.11 Análises moleculares.....	31

3.11.1	Reação de seqüenciamento	33
3.11.2	Análise de similaridade das seqüências	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Construção do vetor de fusão e transformação de <i>A. tumefaciens</i>	34
4.2	Transformação floral de <i>A. thaliana</i>	37
4.3	Análises fenotípicas.....	38
4.3.1	Seleção das plantas apresentando tolerância ao herbicida	38
4.3.2	Seleção das plantas apresentando expressão de EGFP.....	39
4.3.3	Plantas T1 transformadas com o vetor vazio	40
4.3.4	Plantas T2 oriundas de plantas transformadas com o vetor vazio.....	41
4.3.5	Plantas transformadas com os cDNAs fusionados ao vetor ...	42
4.4	Análises moleculares.....	48
4.4.1	Extração de DNA e PCR.....	48
4.4.2	Seqüenciamento dos cDNAs fusionados	49
5.	CONCLUSÃO	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1 – Eficiência de transformação e expressão de GFP.....	43

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Transformação floral de plantas de <i>A. thaliana</i> por aspersão de inóculo contendo <i>A. tumefaciens</i> recombinantes em suspensão.....	22
2. Seleção de sementes T1 oriundas de plantas de <i>A. thaliana</i> , transformadas por <i>A. tumefaciens</i> recombinantes, em meio contendo herbicida glufosinato de amônio.....	23
3. Representação esquemática de seqüências do vetor pEGAD.....	28
4. Representação esquemática da região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao vetor pEGAD para a amplificação do inserto.....	30
5. Produto da digestão por <i>Rsa</i> I da biblioteca de cDNAs de <i>O. sativa</i>	36
6. Eletroforese em gel de agarose de produto de PCR, demonstrando padrão dos fragmentos de cDNAs inseridos em pEGAD.....	37
7. Imagem de células de tecido foliar de planta controle de <i>A. thaliana</i> não submetida à transformação, visualizadas por microscopia de fluorescência.....	40
8. Imagens de células de tecido foliar de plantas de <i>A. thaliana</i> geração T1, transformadas com vetor vazio, visualizadas por microscopia de fluorescência.....	41
9. Imagens de células de tecido foliar de plantas de <i>A. thaliana</i> geração T2, transformadas com vetor vazio, visualizadas por microscopia de fluorescência.....	42
10. Imagens de células de tecido foliar de planta de <i>A. thaliana</i> geração T1, transformadas com vetor possuindo inserção de cDNAs de arroz, visualizadas por microscopia de fluorescência.....	47
11. Eletroforese em gel de agarose de produto de PCR a partir de extração de DNA de <i>A. thaliana</i>	49

1. INTRODUÇÃO

O arroz é a principal fonte nutricional de aproximadamente metade da população mundial, sendo o alimento cultivado mais importante para a humanidade. O fato de possuir um pequeno genoma e de apresentar uma estreita relação sintênica com outras espécies de cereais de importância agrônômica, além de apresentar disponível grande quantidade de mapas genéticos de alta definição, bem como uma extensa coleção de cDNAs, fazem do arroz um modelo para o estudo de genômica de monocotiledôneas. O atual conhecimento sobre a genética molecular do arroz facilitou o progresso do seu seqüenciamento genômico (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv Nipponbare) com mais de 99,99% de confiabilidade utilizando estratégia de seqüenciamento por clonagem baseada em mapa. Outros grupos de pesquisa relataram recentemente esboços de seqüências do genoma de *Oryza sativa* L. ssp. *indica* e *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*. Porém, enquanto a determinação da seqüência genômica proporciona uma abundância de informações, a função da maioria destes genes permanece desconhecida.

Um grande desafio na era pós-genômica é o conhecimento da função de todos os genes de uma determinada espécie. A genômica funcional, através de métodos de análise, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tem por objetivo elucidar o papel de cada gene de um organismo no processo biológico, e

metodologias nesse sentido têm exigido estudos de localização celular e caracterização de função molecular.

O método de localização de proteínas através da visualização de estruturas celulares utilizando fluorescência tem sido empregado com sucesso na investigação da funcionalidade de genes. Esse método tem feito uso de um gene marcador de fácil análise em tecidos vegetais vivos. O gene *gfp* foi isolado a partir da água-viva *Aequorea victoria*, que atua através de uma enzima bioluminescente, a proteína verde fluorescente (GFP), a qual confere a este organismo a propriedade da luminescência verde. O sucesso na expressão de GFP através da bactéria *Escherichia coli* no nematóide *Caenorhabditis elegans* recebeu ampla atenção da comunidade científica nos campos da biologia celular e evolutiva. Com algumas modificações visando à melhoria da expressão, a GFP também tem mostrado ser um excelente cromóforo em células vegetais. A habilidade na introdução de um robusto cromóforo através de uma seqüência genética, combinada com métodos de alta sensibilidade e resolução da microscopia de fluorescência, tem possibilitado à GFP sua aplicação em uma ampla gama de estudos biológicos.

O método de visualização de proteínas de fusão empregando GFP apresenta várias vantagens em relação a outros métodos de localização de produtos protéicos, como aqueles baseados em ensaios histoquímicos. Em vegetais, inicialmente, o endereçamento celular de proteínas era investigado por duas técnicas. A primeira, por fusão utilizando a proteína β -glucoronidase, tendo sido empregada tanto em transformações transitórias quanto estáveis, visualizadas *in situ* por microscopia e coloração histoquímica. A outra, por imunofluorescência indireta, proporcionando uma boa resolução espacial,

porém dependente de anticorpos específicos e requerendo a fixação, combinada com a secção de tecidos ou digestão da parede celular para facilitar o acesso do anticorpo ao antígeno. A detecção de proteínas baseada em fusões de cDNAs com GFP apresenta a vantagem de que células vivas podem ser visualizadas em tempo real e evita os artefatos da fixação. A emissão de luz verde da GFP, quando excitada com luz ultravioleta (UV), permite detecção de fluorescência em células vegetais vivas com alta sensibilidade.

Experimentos com o uso de GFP têm apresentado considerável êxito em *Arabidopsis*. O vasto conhecimento da estrutura genômica dessa planta, aliado às facilidades operacionais dos métodos de transformação genética e da aplicação de técnicas moleculares, têm evidenciado sua importância como espécie vegetal modelo em estudos biológicos. Isto inclui a expressão de proteínas de fusão com GFP oriundas de outras espécies.

O presente estudo teve como objetivo a clonagem de cDNAs de arroz em um vetor de fusão visando a análise funcional destes fragmentos através da localização do produto protéico resultante dessas seqüências. O método utilizado foi a transformação floral de *A. thaliana* via *A. tumefaciens* através da aspersão de colônias recombinantes sobre plantas em florescimento. A avaliação fenotípica dos indivíduos transformantes foi feita através da análise da tolerância das plantas ao herbicida glufosinato de amônio e do padrão de localização de GFP. A avaliação genotípica foi feita através da análise dos cDNAs inseridos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é originário da Índia, sendo hoje cultivado em países de clima subtropical e tropical. É uma espécie pertencente à divisão Angiosperma, classe Monocotiledônea, ordem Poales, família Poaceae, subfamília Oryzoideae, tribo Oryzeae e gênero *Oryza* (Lu, 1999). O gênero *Oryza* inclui muitas espécies distribuídas em todos os continentes, as quais abrigam uma grande variabilidade de hábitos e formas e são encontradas desde em lagos de águas profundas até florestas densas e savanas. Além de *O. sativa*, também é cultivada a espécie *O. glaberrima* Steud., que é o arroz domesticado no oeste da África (Watanabe, 1997).

2.1.1 A importância do arroz

O arroz representa uma das espécies cultivadas mais importantes para a humanidade. Ele alimenta aproximadamente metade da população mundial e contribui com mais de 50% do total de suas calorias ingeridas (Maclean et al., 2002). Apesar de a produção ter duplicado nos últimos 30 anos, devido à introdução de novas variedades de alto rendimento e à melhoria das práticas de cultivo, ainda é insuficiente para atender à demanda global em constante crescimento (Fischer et al., 2000). É necessário o desenvolvimento de variedades de alto rendimento associado à minimização das perdas

decorrentes de estresses bióticos e abióticos. Atualmente, com o desenvolvimento de mecanismos moleculares, o melhoramento genético de plantas pode contar com uma minuciosa compreensão dos aspectos celulares e funcionais da planta, os quais são estabelecidos por sua constituição genética. Assim, é possível que as informações decorrentes da identificação de todos os genes e suas correlações, com a compreensão de suas funções, sejam úteis ao processo de melhoramento genético. Esta idéia evoca o interesse de pesquisadores que contribuem para o desenvolvimento dos estudos em arroz (Tyagi et al., 2004).

2.2 Genômica

2.2.1 A genômica estrutural do arroz

Além da sua fundamental importância como espécie cultivada em nível mundial, o arroz também é uma excelente planta modelo para a genômica, assim como *Arabidopsis* (Izawa & Shimamoto, 1996). Entre os cereais, o arroz é o possuidor do menor genoma, com um tamanho próximo a 430 mega pares de bases (Mpb), quando comparado a genomas de tamanho significativamente maior como sorgo, milho, cevada e trigo, os quais possuem aproximadamente 750, 3.000, 5.000 e 16.000 Mpb, respectivamente.

2.2.2 O arroz como modelo genômico

Alguns resultados indicam a existência de 50.000 genes no genoma do arroz, distribuídos em seus 12 cromossomos, refletindo a densidade aproximada de um gene para cada 8,6 Kpb. Essa densidade gênica é considerada alta quando comparada à de outros cereais, pois o milho

apresenta um gene para cada 100 Kpb, e o trigo um gene para cada 500 Kpb (Yu et al., 2002). Além disso, o arroz possui uma quantidade relativamente menor de DNA repetitivo (Moore et al., 1995; Gale & Devos, 1998). Outros fatores que recomendam o emprego do arroz como espécie vegetal modelo, incluem o fato de que ele pode ser regenerado a partir de protoplastos. Também pode ser transformado por DNA exógeno, pela utilização de métodos de transformação envolvendo *Agrobacterium tumefaciens* ou bombardeamento de partículas, o que o torna um fácil alvo de manipulações genéticas entre os cereais (Tyagi & Mohanty, 2000). O arroz também possui uma vasta coleção de germoplasma, tanto de espécies selvagens quanto de cultivadas (Nakagahra et al. 1997).

Através dos estudos que vêm sendo realizados em genômica do arroz, considerável número de marcadores genéticos foi identificado visando o desenvolvimento de mapas genéticos e físicos deste cereal (Chen et al., 2002). Tais informações também têm sido usadas para estudos de mapeamento comparativo, os quais estabelecem que a ordem gênica é significativamente conservada entre cromossomos de arroz e outros cereais cultivados. Portanto, o arroz é considerado um importante modelo entre as plantas cultivadas, permitindo comparações à dicotiledônea modelo *A. thaliana* e às monocotiledôneas cultivadas como o milho, o trigo e a cevada (Schmit, 2000).

2.2.3 O seqüenciamento genômico do arroz

Adicionalmente à relevância da espécie como modelo entre as plantas cultivadas, a publicação de quatro versões da seqüência genômica de

duas subespécies de *O. sativa* em um curto espaço de tempo (Delseny, 2003) colocou o arroz no primeiro plano dos estudos genômicos.

O conhecimento da seqüência do genoma do arroz, por si só, entretanto, não é o objetivo final da pesquisa genômica. É importante a compreensão das implicações do genoma no funcionamento do organismo. A genômica funcional surge para esclarecer este aspecto (Arber, 2002). As seqüências de DNA do genoma podem ser investigadas visando à identificação de estruturas abertas de leitura (*ORFs*) ou de sinais para sua regulação. Entretanto, para a determinação de sua função, são necessários estudos de genética clássica e, principalmente, genética reversa. Os resultados podem, então, ser comparados aos de outros organismos através de busca por seqüências homólogas, seguidas da função apropriada e análise de expressão (Harris, 2002). Essa informação é um importante pré-requisito para aplicações biotecnológicas, particularmente para o melhoramento através da engenharia de plantas cultivadas (Tyagi, et al., 2004).

O grande acúmulo de dados de seqüências gênicas cuja função não é conhecida motivou o desenvolvimento de técnicas de bioinformática que pudessem transformar as informações do seqüenciamento em informação biológica útil, um processo denominado anotação (Lewis et al., 2000). Em geral, a anotação descreve o genoma por identificar vários sítios e segmentos ao longo da seqüência envolvida no funcionamento do genoma. O objetivo principal é o posicionamento de genes e de elementos relacionados ao funcionamento destes genes ou de seus produtos (Rouzé et al., 1999). Procedimentos automatizados envolvendo mínima quantidade de análises manuais foram utilizados para a geração da maioria dos dados disponíveis do

arroz (Schoof & Karlowski, 2003), permitindo assim a anotação das seqüências.

2.2.4 Genômica funcional

Para a compreensão dos dados rapidamente gerados e acumulados, assim como para o entendimento do funcionamento celular em nível global há a necessidade de uma ferramenta que permita análises de genômica funcional em larga escala. Hieter & Boguski (1997) descreveram o termo “genômica funcional” como o desenvolvimento e a aplicação de métodos experimentais de capacidade de análise em grande escala em nível genômico para avaliar a função dos genes. Os avanços das estratégias de análise funcional podem ser verificados através de técnicas *in vitro* de análise de acumulação de mRNAs e técnicas de análise genética direta e reversa *in vivo* (Rensink & Buell, 2004). Nesse contexto, ferramentas como marcadores moleculares, silenciamento gênico, inativação de genes por inserção de elementos genéticos móveis, indução de mutagênese através da transferência de T-DNA e ensaios de localização de proteínas de fusão utilizando métodos baseados em genes marcadores de fluorescência, constituem mecanismos para o descobrimento da função biológica das seqüências geradas (Waterhouse, 2002; Waterhouse & Helliwell, 2003; Jones et al., 2004).

2.3 Fusão de proteínas em estudos de localização

A fusão de proteínas tem sido amplamente utilizada para a avaliação da expressão de um determinado gene de interesse através de sua ligação a outro gene denominado marcador ou repórter. Marcador é a denominação

dada àquele gene que codifica um produto que pode ser facilmente quantificado após sua fusão a seqüências gênicas de interesse. O mecanismo marcador pode ser baseado na detecção da atividade enzimática, como o gene *gus* ou *gusA*, que codifica a enzima β -glucoronidase (GUS), ou então, detecção de fluorescência ou intensidade colorimétrica ou luminescente, como o gene *LucA*, que codifica a proteína luciferase, que requer um luminômero para a mensuração da sua atividade. Outros genes marcadores são os genes *neo* ou *nptII*, que codifica a proteína neomicina fosfotransferase II (NPTII) e o gene *cat*, da proteína cloranfenicol acetiltransferase, que requerem radioisótopos para sua detecção. Cada um destes mecanismos gera dados que podem ser mensurados e quantificados (Albano et al., 1998).

Na sua maioria, os processos celulares estão espacialmente delimitados a regiões definidas da célula. Mecanismos geralmente elaborados existem para assegurar que proteínas individuais e complexos protéicos sejam endereçados e transportados a locais pré-definidos, freqüentemente em tempos pré-determinados. Portanto, a localização subcelular é uma característica que delimita sua possível função. Entretanto, a localização da maioria das proteínas não foi determinada experimentalmente e os bancos de dados estão repletos de informações em nível de predição. Muitos esforços têm sido empregados no desenvolvimento de sistemas eficazes para a localização de proteínas. A imunolocalização tem sido o método empregado com maior freqüência na determinação de produtos gênicos. Enquanto este método apresenta vantagens como alta especificidade, sensibilidade, resolução e flexibilidade, seus custos excluem sua aplicação imediata em análises genômicas de grande escala. A localização sistemática de proteínas pode ser

obtida em uma escala global através da expressão de proteínas fusionadas a marcadores fluorescentes, usados para o monitoramento tanto da localização quanto do movimento em células vivas (Koroleva et al., 2005).

2.4 O endereçamento polipeptídico em nível subcelular

Uma típica célula vegetal possui entre 5.000 e 10.000 seqüências polipeptídicas diferentes e bilhões de moléculas protéicas individuais. Para seu adequado funcionamento, ela depende do endereçamento correto destas proteínas ao compartimento subcelular alvo, que pode ser único ou em múltiplos locais da célula. Este endereçamento é definido pelos domínios freqüentemente localizados nas extremidades amino-terminal (N-terminal) da seqüência polipeptídica, podendo também estar na extremidade carbóxi-terminal (C-terminal) ou em qualquer outro local da seqüência (Buchanan et al., 2000). Embora o domínio de endereçamento seja essencial para o transporte da proteína, ele pode não ser parte da proteína ativa. Assim, proteases freqüentemente são responsáveis pela remoção deste domínio polipeptídico no local alvo, criando um segmento maduro e funcional. Esses domínios apresentam elevado índice de seqüências conservadas entre os vegetais, o que possibilita a utilização de seqüências de endereçamento de uma espécie em experimentos de transformação em outra, pois proteínas encontradas em uma organela celular de uma determinada planta apresentam a mesma localização subcelular em organismos de outras espécies vegetais. Utilizando esta propriedade de conservação de seqüências, associada à fusão gênica com marcadores autofluorescentes, Tzfira et al. (2005) demonstraram a eficiência da técnica em estudos de localização através da expressão de

proteínas de *A. thaliana* e pepino em plantas de *Nicotiana tabacum* via *A. tumefaciens*.

2.5 As proteínas autofluorescentes

As proteínas autofluorescentes (*autofluorescent proteins - AFPs*) têm se destacado como uma das mais, ou talvez, a mais poderosa ferramenta para a visualização de estruturas em nível celular, localização de proteínas intra e intercelulares, monitoramento da expressão gênica, estudos de interações protéicas *in vivo* e de dinâmica celular, assim como outros experimentos de semelhante importância biológica (Tzfira et al., 2005). Além disso, os avanços observados no campo da microscopia tornaram esta metodologia mais acessível para estudos de muitos processos celulares (Tzfira et al., 2005). A versatilidade e utilidade das AFPs avançaram em decorrência do desenvolvimento de diferentes espectros de emissão e excitação, permitindo seu uso simultâneo para a detecção de diferentes proteínas na mesma célula sem a ocorrência da alteração das características originais destes produtos gênicos, como localização subcelular. Redução de tempo de análise e principalmente minimização de custos são fatores que têm tornado o uso de AFPs especialmente atraente quando comparados aos métodos tradicionais de estudos de localização de produtos protéicos envolvendo fusão de proteínas.

2.5.1 A proteína verde fluorescente

A *green fluorescent protein – GFP* ou proteína verde fluorescente é o produto de um gene marcador relativamente recente que está causando

impacto em muitos aspectos da ciência em função das grandes vantagens que possui sobre outros genes marcadores (Albano et al., 1998). A GFP foi descoberta no início da década de sessenta do último século (Shimomura et al., 1962) na água-viva *Aequorea victoria*. A GFP é caracterizada por uma estrutura individual composta por 238 aminoácidos. Cada monômero possui uma forma tridimensional contendo uma α -hélice central, circundada por um domínio semelhante a um cilindro, formado por 11 fitas, compondo as β -folhas. O sítio ativo da proteína encontra-se ao centro da estrutura e a fluorescência resulta da coordenação de processos de oxidação e ciclização autocatalítica, com a formação de uma série de ligações duplas nos aminoácidos componentes do fluoróforo. A proteína absorve luz ultravioleta ou azul, apresentando espectro de excitação compreendido entre os comprimentos de onda que vão de 395 a 470 nm. O pico predominante é observado a 395 nm e a emissão da luz verde fluorescente é observada a 509 nm (Albano et al., 1998). A detecção de proteínas ocorre através do uso de uma fonte simples de luz UV com longo comprimento de onda. Estas são as propriedades que permitem à GFP ser utilizada como ferramenta na expressão de proteínas recombinantes, tanto como marcador fenotípico em células procarióticas quanto em células eucarióticas (Albano et al., 1998, Cha et al., 2000, Chae et al., 2000, Chalfie et al., 1994, Cheng et al., 1996, DeLisa et al., 1999). Assim, o uso de GFP facilita a construção de marcadores citológicos para o estudo biológico de células vivas através de uma proteína quimérica, formada pela fusão da GFP com uma proteína de interesse (Chalfie et al., 1994, Tsien, 1998). A GFP tem vantagens sobre outras marcações fluorescentes tais como a luciferase. Ela é uma pequena molécula de 26,9 kDa que não requer

quaisquer co-fatores para sua expressão e dispensa qualquer técnica de fixação que possa causar danos às células (Jones et al., 2004). Além disso, quantidades moderadas obtidas em plantas transformadas com esta proteína não possuem relato de interferência significativa nas taxas de transformação, regeneração e crescimento de organismos transformantes.

2.5.2 GFP em plantas

O uso de marcadores autofluorescentes também está se expandindo rapidamente para muitas áreas da pesquisa em plantas (Hanson & Kohler, 2001), indo desde a localização de proteínas e interações protéicas à marcação global de produtos gênicos integrais *in planta* (Tian et al., 2004). Há dois principais empregos de GFP em plantas: monitoramento da expressão gênica e localização de proteínas com alta resolução, mostrando ser um marcador genético de fácil quantificação em vegetais vivos. A GFP pode ser empregada como substituta da β -glucoronidase, a qual é comumente usada como repórter em fusões genéticas vegetais. Ela permite visualização direta de fluorescência no produto gênico em células vivas sem a necessidade de procedimentos destrutivos, como no caso de colorações histoquímicas. Além disso, a expressão da GFP pode ser facilmente quantificada pelo uso de luz UV, caso níveis razoáveis de intensidade de fluorescência possam ser obtidos das plantas transformadas (Haseloff & Amos, 1995).

O uso da GFP como marcador permite a fácil localização subcelular de fusões de proteínas *in vivo*, facilitando em muito os estudos em biologia celular (Escobar et al., 2003). Fusões de fragmentos genômicos ou de cDNAs às extremidades 5' ou 3' do gene codificante da GFP permitiram o

desenvolvimento de métodos de análise em larga escala em biologia celular voltados para a localização de produtos de expressão ectópica em genes de levedura e genes de mamíferos (Misawa et al., 2000). Mais recentemente, uma estratégia de captura de proteínas, na qual o gene *gfp* é conduzido por um éxon artificial móvel, através de um elemento de transposição, foi utilizado para localizar proteínas integrais interrompidas, expressadas a partir de seus loci endógenos em *Drosophila* (Morin et al., 2001). Em plantas, fragmentos de cDNAs randômicos, fusionados à extremidade 3' do gene *gfp* foram transformados em massa em *A. thaliana* através de *A. tumefaciens* para localizar produtos gênicos vegetais (Cutler et al., 2000). Em muitos casos, a localização apresentada por uma proteína vegetal tem uma relação direta com a sua função, determinando seu papel dentro do processo celular. Considerando este fato, diversos métodos de pesquisa vêm sendo empregados para a elucidação da função dos genes de plantas através da localização dos seus respectivos produtos protéicos nos diversos compartimentos subcelulares. Estes métodos têm mostrado efetividade em cloroplastos e membrana plasmática devido ao fato destes poderem ser facilmente fracionados. O uso de fusões com GFP para localizações *in vivo* oferece a perspectiva de uma resolução subcelular muito mais precisa, podendo ser especialmente útil para produtos gênicos localizados em compartimentos que não podem ser facilmente fracionados. Estes benefícios tornam válida essa estratégia, mesmo que as proteínas de fusão expressadas não apresentem viabilidade como as formas nativas (Escobar et al., 2003).

2.6 Transformação genética de plantas

A transformação genética de plantas ocorre pela introdução de DNA em células vegetais. Os métodos mais comuns utilizam a bactéria *A. tumefaciens* ou biobalística, que consiste na intensa propagação de microprojéteis de tungstênio recobertos por DNA (Birch, 1997; Hansen & Wright, 1999). Outros métodos como eletroporação, microinjeção e o uso de vetores virais também têm sido explorados. A fim de permitir a seleção das células transformadas com sucesso, o DNA de interesse é normalmente inserido na adjacência de um gene marcador de seleção, como *nptII*, que codifica para resistência ao antibiótico canamicina (Bent, 2000).

A transformação genética pode ser transitória ou estável, e as células transformadas podem ou não dar surgimento a gametas que irão transferir o material genético às gerações subseqüentes. As transformações transitórias de protoplastos, calos celulares em cultura ou células vegetais são simples e rápidas, podendo ser usadas em estudos da função gênica em curto prazo (Gelvin & Schilperoort, 1998). Devido à grande capacidade de geração de seqüências, esses ensaios em curto prazo são extremamente importantes (Bent, 2000).

2.6.1 Transformação via *A. tumefaciens*

A transformação em plantas mediante *A. tumefaciens* é o método mais utilizado na introdução de genes exógenos em células vegetais com subseqüente regeneração de plantas transgênicas (Batra & Kumar, 2003). A transformação gênica mediante *A. tumefaciens* em monocotiledôneas não era possível, quando métodos eficientes e reproduzíveis foram estabelecidos para

muitas monocotiledôneas como arroz (Hiei et al., 1994, Cheng et al., 1998), (Cheng et al., 1997) e milho (Ishida et al., 1996). Transformações com êxito, também foram relatadas em várias outras espécies, como cevada (Tingay et al., 1997), cana-de-açúcar (Arencibia et al., 1998, Enriquez-Obregon et al., 1998), banana (May et al., 1995), *Asparagus officinalis* (Delbreil et al. 1993), *Agapanthus praecox* (Suzuki et al., 2001). A facilidade com que as transformações são efetuadas e a incorporação de menor número de cópias do transgene, o que é um importante fator na sua preservação através das gerações subseqüentes, são algumas das vantagens do método de transformação mediante *A. tumefaciens* em relação aos demais métodos.

2.7 *A. thaliana* como planta modelo em transformações genéticas

Embora a transformação de plantas seja rotina para muitas espécies vegetais, ainda há uma eficiência baixa do processo em algumas espécies importantes. Assim, estudos relacionados à determinação da função de genes ainda apresentam limites em certas espécies e devem, quando possível, ser conduzidos em plantas modelo. Neste sentido a escolha da planta modelo é de fundamental importância (Aragão et al., 2002).

A habilidade na introdução de DNA em um organismo com a conseqüente alteração do seu fenótipo é essencial tanto para a biologia molecular básica quanto para a aplicada. A transformação é uma tarefa simples em *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, mas ainda complexa em eucariotos multicelulares, e pode ser particularmente desafiante em algumas espécies vegetais de importância agrícola (Bent, 2000). A facilidade com a qual

Arabidopsis pode ser transformada por *Agrobacterium* tem facilitado a produção de grande número de linhas transgênicas independentes. Além disso, *Arabidopsis* tem células grandes, permitindo uma fácil visualização de suas estruturas celulares ao microscópio (Cutler et al., 2000).

Procedimentos de transformação floral utilizando *Agrobacterium* têm apresentado grande êxito em *Arabidopsis*. Tais êxitos, acompanhados das recentes informações sobre os tecidos transformados deste gênero, devem inspirar uma renovação de esforços em adaptar esses métodos à transformação de outras espécies vegetais (Bent, 2000). Os benefícios são claros: transformação sem necessidade de cultura de tecidos pode proporcionar um método de alta capacidade de análise requerendo mínimos esforços, custos e habilidade para ser executado. Além disso, são minimizados os riscos de variação somaclonal, decorrentes da eliminação desta etapa. E o fator mais importante é representado pelos protocolos de transformação simplificados, que facilitam os procedimentos intensivos deste processo, reduzindo o esforço requerido pelos testes de uma determinada construção de transformação de DNA em plantas (Bent, 2000).

2.7.1 Transformação floral

A ocorrência de modificações no DNA é um fenômeno indesejado que acompanha a transformação de células vegetais. O evento está relacionado com o estresse imposto pelos atuais procedimentos de transformação empregados, todos dependentes da diferenciação vegetal resultante da cultura celular *in vitro* (Labra et al., 2004). Larkin & Scowcroft (1981) definiram variação somaclonal como “o resultado de alterações

genéticas e epigenéticas que ocorrem na progênie clonal de um único clone vegetal parental e que são herdados de forma estável pela progênie clonal e sexual”. O método mediado por *Agrobacterium* baseado na infiltração da flor *in planta* é singular no que se refere ao fato de não requerer cultura celular *in vitro* (Bechtold et al., 1993), além disso, não exige a posterior eliminação das células bacterianas do sistema de transformação. Isto leva à captura direta do DNA plasmidial bacteriano pelas células-ovo (ou suas células progenitoras) e à integração do DNA exógeno ao DNA nuclear das sementes transgênicas recuperadas (Clough & Bent, 1998; Desfeux et al., 2000).

Os resultados observados não apresentam alterações genômicas estatisticamente relevantes em plantas transgênicas obtidas por este método, quando comparados com plantas controle não transformadas. Entretanto, alterações genômicas foram observadas em plantas de *A. thaliana* derivadas de calos. Dessa forma, os resultados verificados em plantas de *A. thaliana* sugerem que a variação somaclonal está relacionada com o estresse imposto pela cultura celular *in vitro*, e não pela integração do DNA exógeno (Labra et al., 2004). Assim, através de um ponto de vista prático, a escolha do protocolo de transformação é relevante para a estabilidade do genoma. O método de transformação floral demonstra evitar ou reduzir as alterações do DNA a níveis não detectáveis. Não há razão para que esse método não possa ser estendido a outras plantas, incluindo àquelas de relevância agrônômica (Labra et al., 2004).

2.8 Visualização de estruturas celulares através de GFP

Muito do atual conhecimento que possuímos da estrutura celular deriva do uso de métodos que criam imagens estáticas ou de uma estrutura obscura de células individuais, tais como a análise de amostras de tecidos fixados ou constituintes celulares fracionados. Modelos mais representativos de informação que permitam a dinâmica e estrutura celular ser analisadas em seus estados nativos podem ser obtidos a partir da observação de células vivas. A expressão de marcadores aleatórios de localização em células vivas pode permitir a pesquisa de proteínas com base em propriedades dinâmicas pré-definidas, tais como a redistribuição destes marcadores em resposta a sinais como ferimentos, infecções ou hormônios vegetais (Cutler et al., 2000).

A localização de proteínas como ferramenta em genômica funcional representa um importante avanço. Assim, em função do uso limitado de análises computacionais em estudos de localização, a proteômica requererá avanços adicionais na predição de localização de proteínas em células vegetais. Para facilitar isso, muito mais evidências experimentais são necessárias para a verdadeira localização de produtos gênicos em compartimentos celulares, baseadas na sua expressão por fusão com a GFP ou detecção imunológica usando anticorpos (Tanaka et al., 2004).

Uma chave para a compreensão dos mecanismos que regem o desenvolvimento de um organismo é a detecção das dinâmicas alterações da expressão gênica em seus diferentes territórios. O esclarecimento da função de um gene também requer o conhecimento da localização subcelular de seu produto protéico. Embora anticorpos específicos que reconhecem uma proteína

proporcionem uma grande quantidade de informações, sua confecção requer informações moleculares sobre o gene, além disso, somente podem ser empregados em tecidos fixados. Expressão ectópica de versões marcadas da proteína, em particular fusões com marcações autofluorescentes como a GFP (Chalfie et al., 1994) e suas variantes espectrais, permite um estudo dinâmico do comportamento do produto da fusão em células e tecidos vivos, não fixados (Morin et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As sementes de *A. thaliana* (ecótipo Columbia) foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Carla Andréa Delatorre, do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento Plantas de Lavoura - UFRGS. Essas sementes foram submetidas à quebra de dormência por estratificação, por 4 dias no escuro a 4 °C, em substrato composto por solo e vermiculita expandida de granulometria fina, na proporção 1:1. A semeadura foi realizada em alvéolos de bandejas de isopor flutuantes em água destilada. Após esse período, as bandejas contendo as sementes foram transferidas para câmaras de crescimento climatizadas a 24 °C com luminosidade constante (24h/dia), onde permaneceram até o período de florescimento, o qual ocorreu entre 30 e 50 dias desde o início da germinação.

3.2 Transformação de *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* em estádios iniciais de florescimento (30% a 40% do total de inflorescências abertas) foram aspergidas com o inóculo contendo células transformadas de *A. tumefaciens*. Como dispositivo de aspersão foi empregado um pulverizador plástico de 500 mL contendo 100 mL de suspensão bacteriana (Figura 1). Esta suspensão foi aplicada a uma distância de 30 cm das plantas, sendo distribuída uniformemente sobre a

superfície das flores. As bandejas contendo as plantas aspergidas foram incubadas por 20 horas em câmaras plásticas internamente borrifadas com água destilada. Em seguida, as plantas foram removidas das câmaras plásticas e mantidas em câmaras de crescimento climatizadas a 24 °C com luminosidade constante (24h/dia). Após 10 dias, o processo de inoculação foi repetido nas mesmas plantas, sendo essas mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após o período de incubação em câmaras plásticas, as plantas foram acondicionadas em câmaras de crescimento até a coleta total de sementes maduras. Os mesmos procedimentos foram empregados em um lote de plantas de *A. thaliana* transformadas somente com o vetor de fusão, sem a inserção dos cDNAs (vetor vazio). Um lote de plantas de *A. thaliana* não submetidas a quaisquer eventos de transformação foi mantido em câmara de crescimento nas mesmas condições descritas para plantas transformadas.



FIGURA 1 – Transformação floral de plantas de *A. thaliana* por aspersão de inóculo contendo *A. tumefaciens* recombinantes em suspensão. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

3.3 Análises fenotípicas

3.3.1 Seleção de plantas transformadas de *A. thaliana*

Após a coleta, as sementes maduras provenientes das plantas de *A. thaliana* foram submetidas à quebra de dormência através de estratificação, por

4 dias a 4 °C, isentas de luminosidade, em substrato composto por solo e vermiculita expandida de granulometria fina, na proporção de 1:1. A semeadura foi realizada em alvéolos de bandejas de isopor flutuantes em água destilada na presença de 7,5 mg/L do herbicida glufosinato de amônio (Finale®). As bandejas contendo as sementes foram transferidas para câmaras climatizadas a 24 °C com luminosidade constante (24h/dia) (Figura 2). As plantas foram avaliadas quanto à tolerância ao herbicida 10 dias após a emergência.



FIGURA 2 – Seleção de sementes T1 oriundas de plantas de *A. thaliana*, transformadas por *A. tumefaciens* recombinantes, em meio contendo herbicida glufosinato de amônio. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

3.3.2 Microscopia de epifluorescência

Fragmentos foliares de plantas de *A. thaliana* foram analisados através de visualização por microscopia convencional de epifluorescência para identificar estruturas celulares expressando níveis detectáveis de GFP. Plantas com aproximadamente 20 dias desde a germinação, apresentando 50% do tamanho final da roseta, tiveram um fragmento com tamanho aproximado de 5 mm² da região central da folha destacados para a avaliação por microscopia. Foi utilizado um microscópio de fluorescência modelo BX 41 TF (Olympus), equipado com sistema óptico UIS (sistema de infinito universal) e iluminação do

tipo Koehler. Foi preparada ao menos uma lâmina a partir de cada planta sobrevivente à seleção pelo herbicida. O fragmento removido de folhas jovens foi posicionado com a adição de uma gota de água destilada entre a lâmina e a lamínula de vidro sob leve pressão, e visualizado em sua face adaxial, com aumento de 100 a 1000 vezes. A visualização com aumento de 1000 vezes foi realizada com imersão da objetiva em óleo apropriado. As imagens das amostras foram registradas através de uma câmera fotográfica digital Nikon COOLPIX 4500 (4.0 mega pixels 4 x zoom).

3.4 Biblioteca de cDNAs

No presente trabalho, foi utilizado o método de fusão de proteínas visando à determinação da localização de produtos gênicos de cDNAs em estruturas subcelulares de *A. thaliana*. Através da localização das proteínas codificadas por estas seqüências gênicas é possível a obtenção de informações relevantes para o esclarecimento da sua função. Foram utilizados clones de cDNAs obtidos a partir de uma biblioteca subtrativa supressiva de arroz (Lamb et al., 2005) cedida por Caren R. C. Lamb e Johannes H. Falcade, do Laboratório de Fitopatologia Molecular – LFM do Departamento de Fitossanidade - UFRGS. Estes cDNAs são resultantes de um estudo de expressão gênica de resistência de amplo espectro de um determinado cultivar desta espécie à infecção por *M. grisea*. Os fragmentos diferenciais foram isolados através da subtração de cDNAs induzidos após a inoculação de duas linhas quase isogênicas (NILs), ambas submetidas ao isolado LFM 193.1.1 de *M. grisea*: cDNAs induzidos em C101A51 que possui o gene de resistência *Pi-1* (interação incompatível) menos os cDNAs induzidos no cultivar recorrente

suscetível CO39 (interação compatível). Para a análise da expressão diferencial, as plantas de arroz foram inoculadas com conídios de *M. grisea* e a doença foi avaliada após 15 dias desde a inoculação. A partir do mRNA extraído das plantas correspondentes à NIL C101A51, foi gerada a biblioteca de cDNAs de fita dupla, contendo os genes induzidos na resposta de resistência, conferida pelo gene *Pi-1*.

3.5 Digestão dos cDNAs

Os cDNAs da biblioteca foram digeridos com a enzima de restrição *Rsa* I, que reconhece a seqüência específica de quatro nucleotídeos 5' GT↓AC 3' e fez o polimento dos fragmentos gerando extremidades cegas. A reação foi composta por 2,5 µg de cDNA, tampão REact® 1 10x (Invitrogen) concentração final 1x (50mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂), 5 U da enzima *Rsa* I (Invitrogen), 3,5 µL de H₂O ultrapura, no volume final de 10 µL. O tempo de incubação da reação foi de 2 horas a 37 °C. A inativação da atividade da enzima *Rsa* I foi feita pela elevação da temperatura (desnaturação) a 65 °C por 20 minutos. O tamanho dos fragmentos e a concentração de cDNAs foram estimados pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 1% (TBE 1x) com o auxílio dos marcadores de massa molecular λ Hind III (Promega) e 1kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.6 Digestão e desfosforilação do vetor pEGAD

O vetor de fusão EGFP::cDNA (Cormack et al., 1996) utilizado na clonagem dos cDNAs foi construído a partir do plasmídeo binário pEGAD (Genbank acesso No. AF218816), o qual possui tamanho de 12.594 pb (Cutler et al., 2000). O vetor pEGAD contém o gene que confere resistência ao antibiótico canamicina, para seleção de bactérias *A. tumefaciens* transformadas, e o gene que confere tolerância ao herbicida glufosinato de amônio (Finale®), para seleção de plantas transformadas. Este vetor apresenta um sítio de clonagem para a enzima de restrição *Sma* I, localizado na extremidade 3' do gene codificante da GFP (Figura 3). Pela ausência de códon de terminação de transcrição à jusante gene codificante da GFP, a seqüência de interesse a ele fusionada encontra-se sob a orientação do promotor CaMV 35S, de expressão constitutiva, localizado à montante da fusão cDNA::EGFP. Entretanto a seqüência polipeptídica sinalizadora existente na seqüência de interesse é o fator determinante da localização da expressão do produto protéico da construção gênica. O resultado é a diferenciação da localização da expressão do peptídeo resultante desta fusão. O vetor foi digerido com a enzima de restrição *Sma* I, que reconhece a seqüência específica de seis nucleotídeos 5' CCC↓GGG 3', resultando em uma molécula de DNA linear de extremidades cegas, compatíveis com as extremidades dos cDNAs, após sua digestão. A reação foi composta por 15 µg de DNA, 20mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 30 U da enzima *Sma* I (Gibco BRL®) e 9,0 µL de H₂O ultrapura, em um volume final de 15 µL. O tempo de incubação da reação foi de 1 hora a 30 °C. Imediatamente após a reação de digestão, o vetor foi desfosforilado pela adição de 0,03 U da enzima fosfatase alcalina (Promega) e

5 mM Tris-HCl pH 9,3, 0,1 mM MgCl₂, 0,01 mM ZnCl₂ e 0,1 mM espermidina), em um volume final de 25 µL. A reação foi incubada por 15 minutos a 37°C, seguida de 15 minutos a 56°C, processos que foram repetidos após nova adição de 0,03 U da enzima fosfatase alcalina. O produto foi purificado pela adição de 10% do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M (2,5 µL) e 250% do volume da reação (após adição de acetato de amônio 7,5 M) de etanol 100% (68,7 µL). O material foi homogeneizado e precipitado a -20°C por 1 hora, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 minutos a 4 °C. A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos a 4 °C e ressuspenso em 20 µL de H₂O ultrapura. O tamanho dos fragmentos e a concentração do vetor foram estimados pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 1% (TBE 1x), com o auxílio dos marcadores de massa molecular λ Hind III (Promega) e 1kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

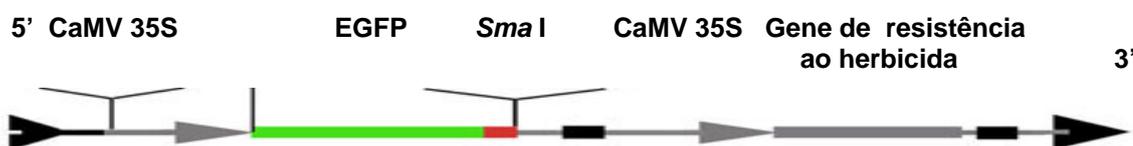


FIGURA 3 – Representação esquemática de seqüências do vetor pEGAD (adaptado de Cutler & Ehrhardt: <http://deepgreen.stanford.edu>).
Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2004.

3.7 Reação de ligação dos cDNAs ao vetor pEGAD

Os cDNAs digeridos foram ligados ao vetor de fusão pEGAD, digerido e desfosforilado, na razão molar inserto:vetor de 3:1. A reação de ligação foi composta por 6,5 ng de DNA do inserto (cDNAs), 77 ng de DNA do vetor de fusão (pEGAD), 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), 50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1,0 mM ATP, 1,0 mM DTT, 25% (v/v) polietilenoglicol 8000, e 4,2 µL de H₂O ultrapura. O volume final da reação de ligação foi de 15 µL e a mesma foi incubada durante 20 horas a 14°C. O produto da reação de ligação foi purificado pela adição de 10% do volume da reação de acetato de amônio 7,5 M (1,5 µL) e 250% do volume da reação (adicionada do acetato de amônio 7,5 M) de etanol 100% (41,2 µL). O material foi homogeneizado e precipitado a -20 °C por 1 hora, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 20 minutos a 4 °C. A fase superior foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo centrifugado a 16.000 x g por 5 minutos a 4 °C e ressuspenso em H₂O ultrapura, no volume final de 3 µL.

3.8 Transformação genética de *A. tumefaciens*

O produto da reação de ligação entre os fragmentos de cDNAs e o vetor foi utilizado para transformação de células de *A. tumefaciens*. Foram utilizadas células da linhagem desarmada LBA 4404, possuidoras em seu cromossomo único, do gene que confere resistência ao antibiótico rifampicina, que permite a seleção de bactérias transformadas. Estas células foram gentilmente fornecidas por Norma Paniego, do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) de Castelar, Argentina, e no presente trabalho, foram tornadas eletrocompetentes conforme descrito no manual de instruções do

eletroporador Micro Pulser™ (Bio-Rad). Três microlitros (aproximadamente 100 ng) do produto da reação de ligação foram adicionados a 20 µL de células eletrocompetentes. Essas células foram transformadas geneticamente por choque elétrico (eletroporação) de acordo com as instruções do fabricante do eletroporador (Micro Pulser™, Bio-Rad). Em seguida, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura líquido Luria-Bertani - LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl - pH 7,5, esterilizado por autoclavagem). As células foram então incubadas por 3 horas a 28 °C com agitação de 250 rpm. Após, o meio contendo as células bacterianas foi centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL. A seleção das colônias recombinantes (colônias positivas) foi realizada através da distribuição das bactérias em placas de Petri contendo meio seletivo. As células foram distribuídas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido LB (adicionado de ágar 1,6% p/v) com os antibióticos rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 48 horas até o momento da visualização das colônias bacterianas recombinantes.

3.9 Identificação de colônias de *A. tumefaciens* contendo plasmídeos recombinantes

A avaliação da transformação bacteriana foi realizada através da análise do padrão da massa molecular do fragmento do vetor amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizada PCR de amostras coletadas de 100 colônias (20%) do total das colônias individuais crescidas em placa de Petri visando a identificação de células de *A. tumefaciens* possuidoras dos plasmídeos recombinantes. Foram utilizados os

oligonucleotídeos iniciadores A5A For (5' - CTC GGC ATG GAC GAG CTG – 3') e EGAD Rev (5' - TCC TCG AGA TCA GTT ATC TAG – 3'), baseados nas seqüências de nucleotídeos do vetor pEGAD, flanqueadoras dos cDNAs inseridos (Figura 4). A PCR foi composta por 0,15 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 3,75 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,1 µL de cada colônia bacteriana amostrada, totalizando um volume final de 20 µL. A PCR foi realizada em um termociclador PTC - 100™ (MJ Research, Inc.), sob os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 94 °C por 10 minutos; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 50 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. O produto da reação foi analisado através do perfil eletroforético obtido em gel de agarose 3% contendo tampão TBE 1x, com o auxílio do marcador de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL®), seguido da exposição em solução contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

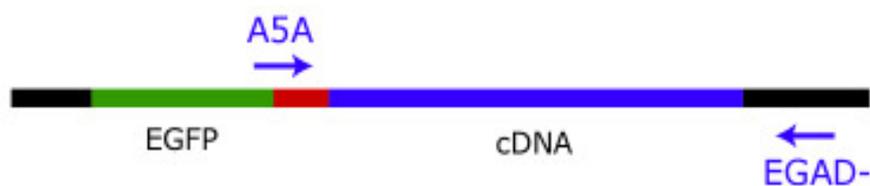


FIGURA 4 – Representação esquemática da região de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao vetor pEGAD para a amplificação do inserto (adaptado de Cutler & Ehrhardt: <http://deepgreen.stanford.edu>). Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2004.

3.10 Preparo das culturas de *A. tumefaciens* para transformação de plantas

Visando o estabelecimento de uma estratégia para utilização em larga escala que suprimisse a etapa de seleção de colônias transformadas por vetor recombinante através de PCR, um pré-inóculo foi preparado a partir da coleta total das colônias bacterianas crescidas em placa de Petri. As bactérias foram multiplicadas em meio de cultura líquido LB, adicionado dos antibióticos seletivos rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (100 µg/mL) e incubadas a 28 °C, 150 rpm por 12 horas. Foi utilizada a proporção de uma colônia bacteriana recombinante para cada 1 mL de meio, no volume final de 500 mL. O inóculo foi composto por 1 mL de pré-inóculo para cada 49 mL de meio de cultura líquido LB adicionado dos antibióticos seletivos citados, no volume final de 250 mL, incubado a 28 °C, 150 rpm por 12 horas. A concentração bacteriana da suspensão foi estimada por leitura em espectrofotômetro (Smart Spec™ Bio-Rad) (~2,0 = OD₆₀₀). A suspensão bacteriana foi transferida para tubos Falcon e centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em uma solução de sacarose a 5%, surfactante Silwet® L-77 Ag a 0,05%, no volume final de 100 mL de água destilada e autoclavada. A concentração bacteriana do inóculo foi estimada por leitura em espectrofotômetro (Smart Spec™ Bio-Rad) (~2,0 = OD₆₀₀).

3.11 Análises moleculares

As plantas de *A. thaliana* foram submetidas a análises moleculares a partir de 100 mg de tecido vegetal que foi extraído e triturado na presença de N₂ líquido em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida, foram

adicionados 750 μ L de tampão de extração CTAB (CTAB, 55 mM; Tris, 100 mM pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 μ L de 2-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 minutos, incubada a 65°C durante 15 minutos e posteriormente, acrescentados 520 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v:v). A mistura foi novamente homogeneizada vigorosamente por 1 minuto e centrifugada por 10 minutos a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase líquida sobrenadante foi transferida para um novo tubo, à qual foi adicionado igual volume de isopropanol (500 μ L) e 50% do volume de acetato de amônio 7,5 M (250 μ L). Em seguida, foi centrifugada por 10 minutos a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por duas vezes, centrifugado por 5 minutos a 18.400 x g, seco a 65 °C e solubilizado em 100 μ L de H₂O ultrapura. A quantidade e qualidade do DNA foram estimadas em espectrofotômetro (Smart SpecTM Bio-Rad) (OD₂₆₀) e o material extraído foi armazenado a -20 °C. Todas as extrações foram realizadas em duplicata.

A verificação da transformação genética das plantas de *A. thaliana* foi realizada através da amplificação da seqüência inserida no vetor através de PCR, da mesma forma anteriormente descrita para a identificação de células de *A. tumefaciens*. O tamanho dos fragmentos foi estimado pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 2% (TBE 1x) com o auxílio do marcador de massa molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

3.11.1 Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul), PUC/RS, através do sistema “DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE DNA Analysis Systems” no seqüenciador automático MegaBACE (Amersham Biosciences), utilizando 100 ng do produto de PCR e 2,5 mM do oligonucleotídeo iniciador EGAD antisense (5'- TCC TCG AGA TCA GTT ATC TAG -3'), seguindo as instruções do fornecedor.

3.11.2 Análise de similaridade das seqüências

Os eletroferogramas obtidos do seqüenciamento foram analisados através do programa Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd.). Após, foi realizada a comparação das seqüências obtidas com as seqüências de nucleotídeos (BLASTN) depositadas no GenBank - National Center of Biology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), através do programa BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (Altschul et al., 1997)].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do vetor de fusão e transformação de *A. tumefaciens*

Os cDNAs de arroz foram digeridos com a enzima de restrição *Rsa* I, gerando extremidades cegas e permitindo sua inserção no vetor de fusão pEGAD (Genbank acesso No. AF 218846). Após a reação de digestão, foram obtidos fragmentos apresentando tamanho estimado entre 300 e 900 pb (Figura 5) que foram inseridos no vetor de fusão pEGAD. As fusões cDNA::EGFP foram introduzidas em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens* por eletroporação. Foram selecionadas aproximadamente 500 colônias de *A. tumefaciens* resistentes, após 48 horas de crescimento. Entre estas, foram identificadas quatro colônias recombinantes apresentando fragmentos de tamanhos aproximados a 600, 650, 700 e 800 pb (Figura 6). As demais colônias crescidas apresentaram um fragmento de 117 pb referente à amplificação da seqüência do vetor pEGAD sem inserto (vetor vazio), conforme estudo relatado por Cutler et al. (2000). Desse modo foi estimada a quantidade de 20 colônias possuindo o vetor recombinante em relação ao total de colônias bacterianas obtidas. O índice de 4% de colônias bacterianas transformadas com o vetor recombinante, possivelmente está associado à ocorrência de uma etapa incompleta durante o preparo do vetor para a clonagem dos cDNAs. A grande quantidade de colônias amostradas apresentando 117 pb, quando

comparada ao número de colônias apresentando vetor recombinante, sugere que a transformação destas células tenha ocorrido somente com o vetor vazio, como resultado da pouca eficiência da etapa de digestão deste plasmídeo. Isto explica a ocorrência da grande quantidade de colônias resistentes ao meio seletivo, porém sem a inserção dos cDNAs. As bactérias crescidas em placas foram aspergidas sobre as plantas de *A. thaliana* através de uma suspensão composta por sacarose, adicionada do surfactante Silwet® L-77. Foram testadas diferentes concentrações do surfactante, assim como diferentes intervalos entre a primeira e segunda aspersão. Observou-se que concentrações do surfactante superiores a 0,05% resultaram em um aumento significativo de regiões necrose das plantas, a partir das bordas foliares, levando ao aumento de indivíduos mortos no prazo de sete dias. Os resultados mais eficientes foram obtidos com a utilização do surfactante na concentração máxima de 0,05% associada ao intervalo de dez dias entre as duas aspersões. Dessa forma, foi observada menor quantidade de indivíduos mortos, menores regiões de necrose nas plantas sobreviventes e maior quantidade de sementes provenientes dessas plantas.

Clough & Bent (1998) relataram que um inóculo composto por *A. tumefaciens* apresentando a concentração de 0,15 a 1,75 (OD₆₀₀) não altera a taxa de eficiência da transformação. No estudo realizado por Cutler et al., (2000), no qual uma biblioteca de cDNAs foi introduzida em *A. thaliana* através de *A. tumefaciens*, a densidade óptica do inóculo foi de aproximadamente 0,5 (OD₆₀₀). Entretanto, no estudo de Martínez-Trujillo et al. (2004), foi demonstrado que 2,0 (OD₆₀₀) elevou a eficiência da transformação em mais que o dobro que aquela produzida com 0,8 (OD₆₀₀). Esta elevação no índice de

transformação possivelmente está relacionada com a existência de maior quantidade de células bacterianas viáveis sobre a superfície das plantas, apresentando a capacidade de transferir as seqüências de interesse para o interior das células vegetais. Visando a obtenção de maior eficiência no índice de transformação floral em relação ao estudo relatado por Clough & Bent (1998), a leitura da densidade óptica da cultura bacteriana do inóculo aplicado em plantas de *A. thaliana* foi de aproximadamente 2,0 (OD₆₀₀).

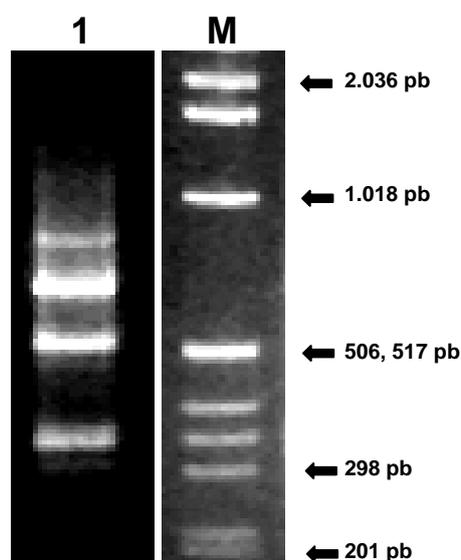


FIGURA 5 – Produto da digestão da biblioteca de cDNAs de *O. sativa* por *Rsa* I. Gel de agarose 2% demonstrando padrão dos fragmentos separados por eletroforese. 1 - cDNAs; M - marcador de peso molecular. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2004.

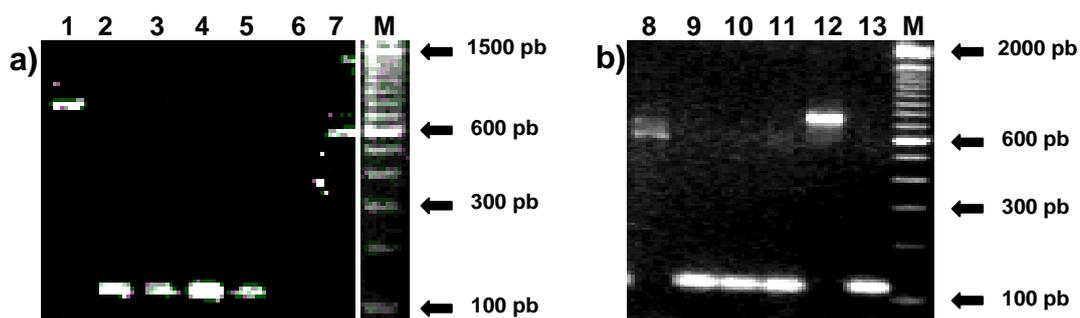


FIGURA 6 – Eletroforese em gel de agarose 3% de produto de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores A5A (FOR) e EGAD (REV), demonstrando padrão dos fragmentos de cDNAs inseridos em pEGAD, a partir de colônias de *A. tumefaciens* transformadas. (a) 1 e 7 – amplificação de fragmento de cDNA inserido no vetor; 2 a 5 – vetor vazio; 6 – controle negativo; M – marcador de peso molecular. (b) 8 e 12 – amplificação de fragmento de cDNA inserido no vetor; 9, 10, 11 e 13 – vetor vazio; M – marcador de peso molecular. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

4.2 Transformação floral de *A. thaliana*

De modo a serem minimizadas as alterações indesejáveis do DNA observadas em processos de transformação de células vegetais, decorrentes da utilização de protocolos convencionais (Labra et al., 2004), neste trabalho foi utilizado o método de transformação floral, no qual os óvulos representam o alvo da transformação via *A. tumefaciens* (Desfeux et al., 2000). Foram utilizadas 550 plantas de *A. thaliana* para a transformação genética. As plantas foram conduzidas sob condições controladas desde a germinação até estádios iniciais de florescimento, a partir do qual foram submetidas a dois diferentes tipos de tratamento. Foi conduzido também, um lote de 20 plantas controle de *A. thaliana*, que foram mantidas sob as mesmas condições descritas para as plantas transformadas, porém não foram submetidas a quaisquer eventos de transformação. Essas plantas foram mantidas como padrão comparativo nos experimentos de localização de GFP e análises moleculares.

Um estudo realizado por Clough & Bent (1998), demonstrou que no estágio de desenvolvimento caracterizado pela existência de brotos secundários apresentando dimensões de 2 a 10 cm (poucas flores abertas), a planta encontra-se mais suscetível à transformação. Assim, as plantas de *A. thaliana* em estádios iniciais de florescimento, distribuídas em dois lotes distintos (50 e 500 plantas), foram submetidas à transformação em duas etapas de aspersão, no intervalo de dez dias. Cinqüenta plantas receberam o inóculo composto por *A. tumefaciens* contendo o vetor pEGAD vazio (sem a inserção dos cDNAs), através do mesmo método utilizado nas plantas transformadas com o vetor recombinante. As demais 500 plantas receberam o inóculo obtido a partir de 500 colônias de *A. tumefaciens* recombinantes crescidas em placa de Petri. Essas colônias foram obtidas por transformação dos clones de cDNAs, provenientes da biblioteca subtrativa supressiva de arroz, anteriormente citada, fusionados ao vetor pEGAD. Ambos os lotes foram acondicionados em câmaras de crescimento até a coleta de aproximadamente 35.000 sementes maduras, provenientes de plantas transformadas com o vetor vazio e 25.500 sementes maduras, provenientes de plantas transformadas com os cDNAs fusionados ao vetor.

4.3 Análises fenotípicas

4.3.1 Seleção das plantas apresentando tolerância ao herbicida

As sementes das plantas transformadas foram submetidas à germinação em lotes distintos nas condições citadas anteriormente, com a adição de agente seletivo composto por glufosinato de amônio. A partir das

35.000 sementes maduras, provenientes de plantas transformadas com o vetor vazio, foi observado o desenvolvimento de aproximadamente 800 plantas de *A. thaliana* (2,28% das sementes) apresentando tolerância ao meio seletivo.

A partir das 25.500 sementes maduras, provenientes de plantas transformadas com os cDNAs fusionados ao vetor, foram obtidas 750 plantas T1 (2,94% das sementes) apresentando tolerância ao meio seletivo. Estes resultados são similares ao índice de transformação relatado por Cutler et al. (2000), no qual 0,5 a 4% das plantas T1 eram transgênicas.

4.3.2 Seleção das plantas apresentando expressão de EGFP

Foi realizada a visualização por microscopia de fluorescência das plantas de *A. thaliana* transformadas. O material foliar coletado a partir de folhas destacadas foi analisado quanto à expressão de EGFP sob luz UV e comparado ao material extraído de plantas controle, representado por plantas não transformadas (Figura 7). O tecido foi extraído de folhas jovens e visualizado na sua face adaxial sob luz UV. As imagens de microscopia obtidas de fragmentos foliares retirados após duas horas das plantas apresentaram perda de brilho do sinal fluorescente, ocasionando maior dificuldade na definição da localização da GFP em nível subcelular. Este fato, possivelmente, é decorrente da oxidação do fluoróforo e conseqüente degradação da proteína. De modo a serem evitadas interpretações errôneas dos resultados, amostras removidas após quatro horas foram desconsideradas em função da acentuada perda de qualidade das imagens. As imagens válidas foram registradas e armazenadas por método digital.

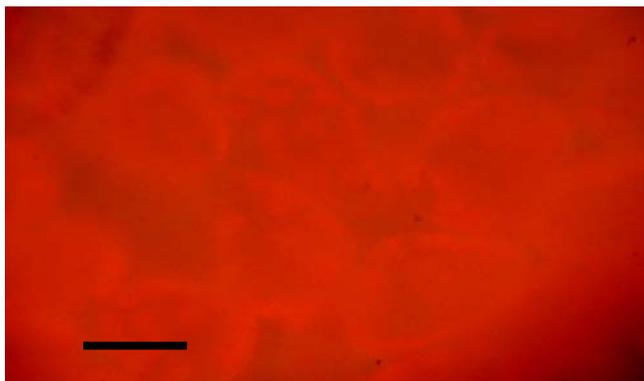


FIGURA 7 – Imagem de células de tecido foliar de planta controle de *A. thaliana* não transformada, visualizada por microscopia de fluorescência. O padrão de cor vermelha corresponde ao reflexo da cor verde da clorofila visualizada à luz ultravioleta. Aumento de 1000 vezes. Barra representa 20 μm . Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

4.3.3 Plantas T1 transformadas com o vetor vazio

De um total de 800 plantas apresentando tolerância ao herbicida, correspondendo à geração T1 de plantas transformadas com o vetor vazio, 16 (2%) apresentaram níveis detectáveis de expressão de EGFP quando comparado às plantas controle de *A. thaliana*. As imagens apresentaram um padrão de distribuição generalizado do sinal fluorescente nos diversos compartimentos subcelulares, conforme o esperado para plantas transformadas com o vetor vazio (Figura 8 a,b).

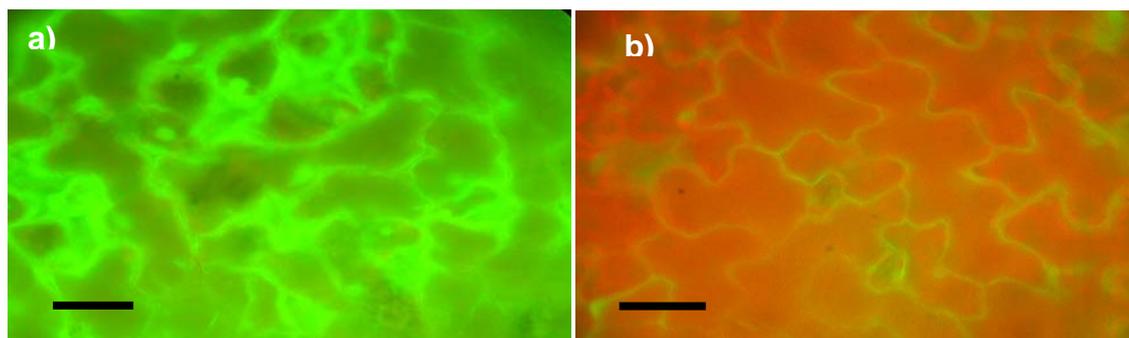


FIGURA 8 – Imagens feitas através de microscopia de fluorescência de células de tecido foliar de plantas geração T1 de *A. thaliana* transformadas com vetor vazio exibindo expressão de EGFP distribuída de forma generalizada através das células. a - visualização da expressão de GFP sob ajuste normal da objetiva; b - visualização da expressão de GFP sob ajuste fino da objetiva. Aumento de 1000 vezes. Barras representam 20 μm . Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

4.3.4 Plantas T2 oriundas de plantas transformadas com o vetor vazio

As plantas T1 transformadas com o vetor vazio foram autofecundadas, gerando sementes que foram conduzidas até a geração T2. As plantas T2 foram avaliadas quanto à estabilidade da transformação. A partir de 500 sementes coletadas de 16 plantas da geração T1, foram obtidas 267 (53,4% das sementes) plantas T2 apresentando tolerância ao herbicida, das quais 168 (62,92%) apresentaram níveis detectáveis de expressão de EGFP. As imagens apresentaram um padrão de distribuição generalizado do sinal fluorescente nos diversos compartimentos subcelulares, conforme esperado de plantas transformadas com vetor vazio (Figura 9). Através da tolerância ao herbicida, observado pela exposição ao meio seletivo e da presença da fluorescência, visualizada por microscopia, foi confirmada a estabilidade da transformação na progênie, esperada para a geração de plantas T2. Assim, as características observadas na geração T2 atestam a integridade das

seqüências inseridas na geração T0, herdadas de forma estável nas gerações subseqüentes até a segunda geração transformada.

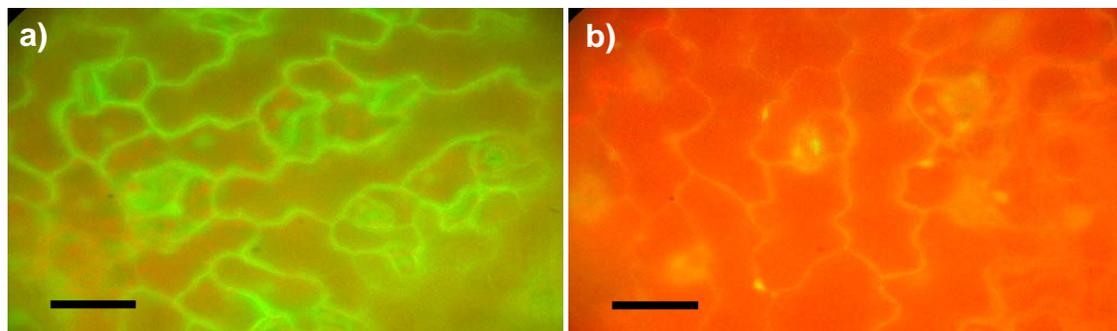


FIGURA 9 – Imagens feitas através de microscopia de fluorescência de células de tecido foliar de plantas geração T2 de *A. thaliana* transformadas com vetor vazio exibindo expressão de EGFP distribuída de forma generalizada através das células. a - visualização da expressão de GFP sob ajuste normal da objetiva; b - visualização da expressão de GFP sob ajuste fino da objetiva. Aumento de 1000 vezes. Barras representam 20 μ m. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

4.3.5 Plantas transformadas com os cDNAs fusionados ao vetor

De um total de 750 plantas apresentando tolerância ao herbicida, correspondendo à geração T1 de plantas transformadas com os cDNAs fusionados ao vetor, 18 (2,40%), apresentaram níveis detectáveis de expressão de GFP (Tabela 1). Estes resultados foram um pouco superiores ao índice de fluorescência relatado por Cutler et al. (2000), onde 0,1 a 1% das plantas apresentou níveis detectáveis de expressão de EGFP quando comparado às plantas controle de *A. thaliana*.

TABELA 1 – Eficiência de transformação e expressão de GFP. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

	Sementes obtidas de plantas transformadas	Plantas tolerantes ao herbicida	Plantas tolerantes expressando GFP
Geração T1 transformada com pEGAD vazio	35.000	800 (2,28 % das sementes)	16 (2 % das plantas tolerantes)
Geração T2 transformada com pEGAD vazio	500	267 (53,4 % das sementes)	168 (62,92 % das plantas tolerantes)
Geração T1 transformada com pEGAD recombinante	25.500	750 (2,94 % das sementes)	18 (2,4 % das plantas tolerantes)

Foi observada uma discrepância entre o número de plantas tolerantes ao herbicida e plantas apresentando níveis detectáveis de expressão de GFP. Esta diferença se manteve constante tanto em plantas T1 e T2 transformadas com o vetor vazio quanto em plantas transformadas com o vetor recombinante. Este fato pode estar associado a danos na seqüência codificante da GFP ocorridos durante os processos de preparação do DNA e transformação de bactérias e plantas. Além disso, somente as plantas apresentando tolerância ao herbicida foram submetidas à detecção do sinal fluorescente, o que pode justificar o constante maior número de plantas tolerantes em relação ao número de fluorescentes. Assim como as sementes não germinadas, não foram contabilizadas as plantas germinadas e mortas antes de apresentar dimensões mínimas que permitissem retiradas de tecido para visualização por microscopia. Considerando que a GFP apresenta certo grau de toxicidade, plantas não tolerantes ao herbicida contendo elevada

quantidade desta proteína podem ter morrido antes de ser analisadas e contabilizadas. De outra forma, plantas tolerantes contendo níveis baixos e não detectáveis de GFP não foram consideradas fluorescentes. Podendo assim, ter elevado o índice observado de diferença entre tolerantes e fluorescentes.

No presente trabalho foram introduzidos cDNAs de arroz diferencialmente expressos em resposta a *M. grisea*. Os cDNAs foram inseridos no vetor pEGAD, na extremidade 3' de uma variante do gene EGFP. Através deste método foi esperada a tradução de aproximadamente uma em cada seis fusões GFP::cDNA na pauta correta de leitura e com a possibilidade de alterar a localização inespecífica do sinal fluorescente. Este fato é decorrente de três possibilidades diferentes de inserção para cada uma das duas orientações possíveis de cada fragmento, em função das extremidades cegas geradas nos clones de cDNAs e vetor. No estudo realizado por Cutler et al. (2000), uma biblioteca de cDNAs de *A. thaliana* foi introduzida em plantas da mesma espécie. O índice de eficiência esperado para o endereçamento da proteína foi de um em três, uma vez que os cortes feitos nos fragmentos geraram extremidades coesivas, permitindo a sua inserção orientada. No presente trabalho foi observada a distribuição generalizada de GFP em 17 plantas transformadas por *A. tumefaciens* com vetor fusionado aos cDNAs. Foi observada uma planta apresentando expressão diferenciada do sinal fluorescente em relação às demais fluorescentes, representando o índice de eficiência de fusão de 0,13% das plantas transformadas apresentando uma distribuição subcelular localizada da fusão de proteínas, caracterizada pela expressão de GFP. O grande número de plantas apresentando distribuição generalizada, comparado ao número de plantas apresentando distribuição

localizada de GFP, possivelmente está relacionado ao maior número de inserções de cDNAs fora da pauta de leitura esperada. Este fato é decorrente da clonagem não orientada do fragmento em função das enzimas de restrição utilizadas tanto no vetor, quanto nos cDNAs. As enzimas utilizadas geraram fragmentos passíveis de formação de concatâmeros, o que pode ter aumentado o número de insertos incapazes de orientar o endereçamento correto do peptídeo fusionado ao gene EGFP. Além disso, a enzima *Rsa* I, utilizada na digestão dos cDNAs, é considerada de corte freqüente pelo fato de reconhecer uma seqüência de quatro nucleotídeos. Esta propriedade pode resultar na geração de grande quantidade de fragmentos sem uma seqüência mínima funcionalmente capaz de endereçar corretamente o peptídeo ao compartimento subcelular esperado, conforme descrito no estudo realizado por Cutler et al. (2000). Considerando que o endereçamento correto do peptídeo está condicionado tanto à integridade quanto a uma quantidade mínima de aminoácidos que permitam sua funcionalidade, os endereçamentos inespecíficos observados podem ser resultado do pouco conteúdo informativo existente nos cDNAs, em função de seus reduzidos tamanhos. Estas restrições podem ser futuramente minimizadas pela utilização de enzimas de restrição de corte coesivo e de menor freqüência.

No estudo realizado por Oard & Enright (2006), foi observada a atividade antimicrobiana de peptídeos codificados por genes que foram introduzidos em *A. thaliana*. A fusão com EGFP demonstrou a acumulação da proteína β -Purotionina em tricomas da planta pelo redirecionamento do sinal fluorescente. A proteína quimérica deteve o desenvolvimento de um fungo patogênico na superfície foliar e estômatos, demonstrando atividade

semelhante à observada *in vitro*. No presente trabalho, as estruturas da planta que apresentaram maior acúmulo de fluorescência foram células-guarda estomáticas e tricomas (Figura 10 a - h). Foi observado menor índice de fluorescência na região de contato entre as demais células quando comparado às imagens obtidas de células de plantas transformadas com o vetor vazio. Este fenótipo pode ser decorrente do direcionamento de EGFP a determinadas localizações pela fusão de seu gene codificante ao produto protéico dos cDNAs de arroz. As seqüências dos cDNAs utilizados no presente estudo não eram conhecidas. Entretanto, a planta que apresentou expressão diferenciada de EGFP pode ter tido o endereçamento do sinal fluorescente orientado pelo domínio localizado na extremidade N-terminal do peptídeo quimérico, o que era esperado, resultando em uma maior expressão de EGFP em células-guarda estomáticas e nos tricomas, como anteriormente citado. As imagens relatadas neste trabalho foram realizadas através de microscopia de epifluorescência convencional. Entretanto, grande quantidade de estudos realizados visando localização de proteínas de fusão têm utilizado microscopia confocal. Considerando os estudos anteriormente citados, podemos inferir que a utilização de microscópio confocal de fluorescência neste trabalho poderia ter permitido a observação de imagens subcelulares com maior profundidade e resolução.

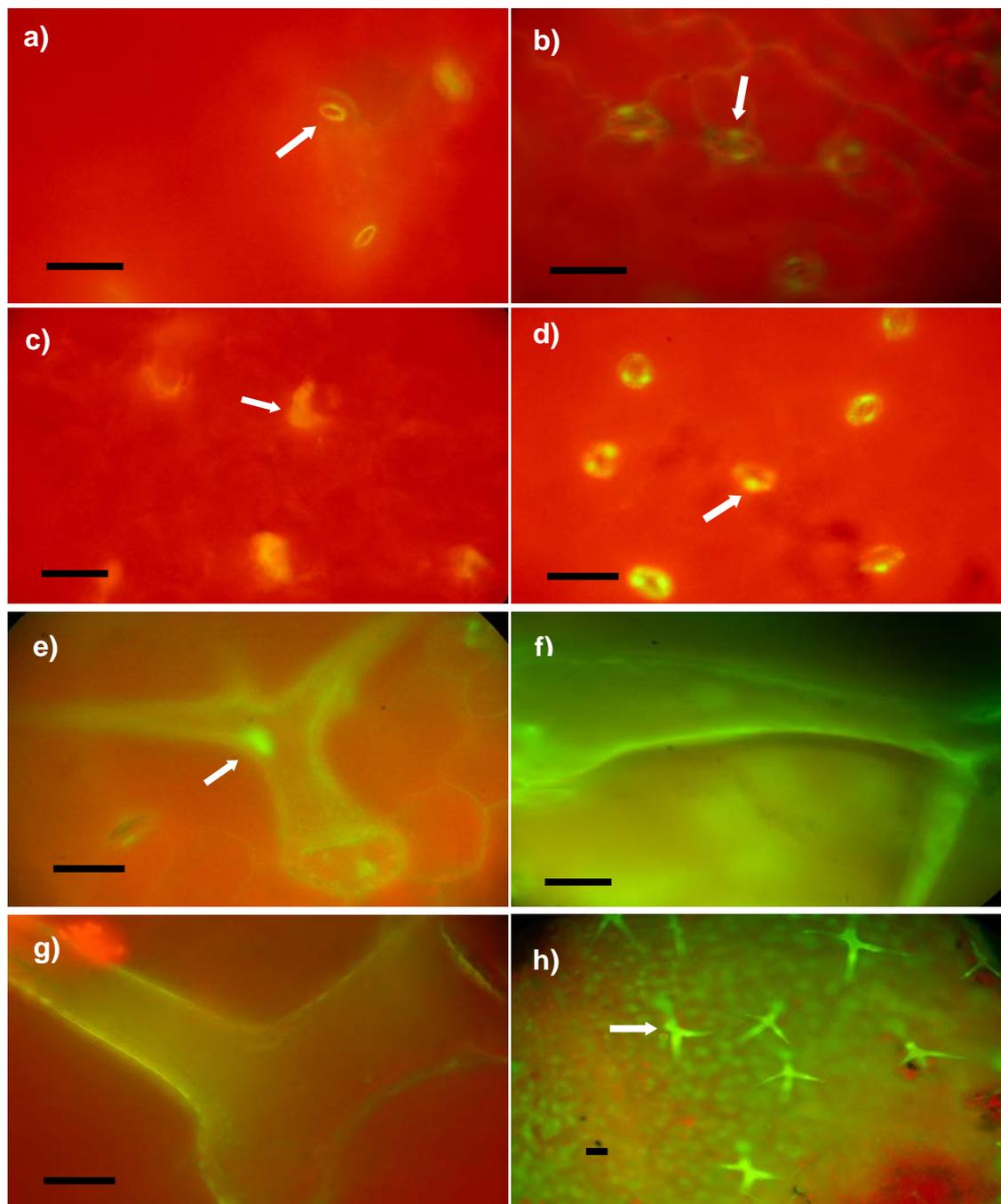


FIGURA 10 – Imagens de células de tecido foliar de planta de *A. thaliana*, geração T1, transformadas com vetor contendo fusões EGFP::cDNAs. a – d - expressão de GFP apresentando maior concentração em estômatos; e – h - expressão de GFP apresentando maior concentração em tricomas. a – g - aumento de 1000 vezes, h - aumento de 100 vezes. Barras representam 20 μm . Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2005.

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Extração de DNA e PCR

Das 750 plantas da geração T1 de *A. thaliana* transformadas por *A. tumefaciens* contendo os cDNAs fusionados ao vetor pEGAD, 18 foram submetidas a análises moleculares a partir da extração de DNA.

A verificação da transformação das plantas foi realizada através da amplificação da seqüência inserida no vetor pEGAD, através de PCR com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores A5A For e EGAD Rev, da mesma forma descrita anteriormente para a identificação de células de *A. tumefaciens* recombinantes. Das 18 plantas apresentando tolerância ao herbicida e expressão de GFP, foram observadas duas apresentando inserções de tamanhos estimados em 750 e 800 bp (Figura 11). A amostra que apresentou o fragmento de 750 pb corresponde à planta que apresentou expressão diferenciada do sinal fluorescente nos estômatos e nos tricomas. A localização diferenciada do sinal fluorescente observada sugere que o cDNA, fusionado ao gene repórter, tenha sido conduzido às localizações subcelulares observadas, redirecionando a localização da expressão da GFP. A amostra que apresentou fragmento de 800 pb corresponde a uma planta que apresentou expressão generalizada do sinal fluorescente. Apesar de a fusão gênica entre o cDNA e GFP ter sido comprovada por eletroforese, não foi observado o redirecionamento da localização da proteína fluorescente, quando comparado às imagens obtidas de expressões do vetor vazio. Este resultado pode estar associado à ausência de conteúdo informativo no cDNA que permitisse o endereçamento da fusão cDNA::GFP ao compartimento subcelular adequado. As demais amostras apresentaram fragmentos de tamanhos estimados em 117

pb, constituindo plantas transformadas com vetores não recombinantes. Considerando que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR amplificaram 117 pb do vetor pEGAD, as amostras apresentando fragmentos correspondem efetivamente a 633 e 683bp. Este padrão é tido como esperado, uma vez que os fragmentos observados após a digestão da biblioteca de cDNAs apresentaram tamanhos estimados entre 300 e 900 pb, conforme anteriormente citado.

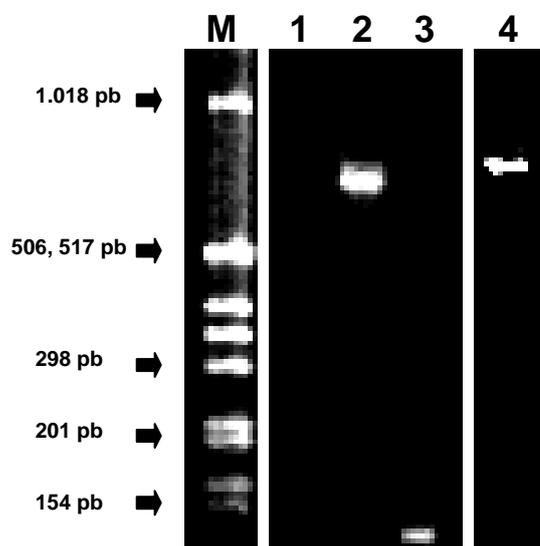


FIGURA 11 – Eletroforese em gel de agarose 2% de produto de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores A5A (FOR) e EGAD (REV), a partir de extração de DNA de planta T1 de *A. thaliana* transformada por *A. tumefaciens*. M – marcador de peso molecular; 1 – controle negativo; 2 e 4 – amplificação de cDNAs inseridos no vetor; 3 – vetor vazio. Porto Alegre, RS, UFRGS, LFM, 2006.

4.4.2 Seqüenciamento dos cDNAs fusionados

Foi realizado o seqüenciamento a partir de 100 ng do produto de PCR referente às amostras que apresentaram o cDNA inserido no vetor pEGAD. As seqüências obtidas foram comparadas às seqüências depositadas no Genbank através do programa BLASTN. No presente trabalho, a seqüência

obtida através do clone referente ao fragmento de 683 pb apresentou similaridade pouco significativa à seqüência codificante da proteína encontrada no organismo *Drosophila melanogaster*, com escore de 42.1 e valor de E de 0,78. A mesma não apresentou similaridade significativa à seqüência de arroz ou de outro organismo quando analisada por este algoritmo. Considerando esses valores, podemos inferir que este fragmento não corresponde efetivamente à seqüência de *Drosophila*. Possivelmente tenha resultado da inserção do cDNA fora da estrutura leitura esperada, onde o peptídeo gerado mostrou similaridade aleatória e não significativa à seqüência depositada no banco de dados. Entretanto, a seqüência referente ao fragmento de 633 pb, que corresponde à planta que apresentou expressão localizada de GFP, mostrou similaridade significativa à seqüência do cromossomo 12 de arroz, com escore de 202 e valor de E de $2e^{-48}$, quando submetida ao BLASTN. Este clone também apresentou uma seqüência de 280 pb apresentando similaridade de 92%, escore 202, valor de E de $2e^{-48}$ à seqüência que codifica uma proteína quinase (GenBank Acesso No. DP 000011). Estas proteínas, juntamente com cálcio citosólico, respondem pelas duas principais rotas de transdução de sinais encontradas em células vegetais, constituindo uma rede de alta complexidade. Consideradas elementos primários na transdução de sinais, as quinases são enzimas responsáveis pela percepção de estímulos extracelulares através de receptores localizados na membrana plasmática e parede celular. Freqüentemente alteram a atividade das proteínas-alvo pela fosforilação da região C-terminal, que se encontra do lado de dentro da célula, de proteínas receptoras transmembrana. As quinases possuem sua atividade contrabalançada pela ação de proteínas fosfatase específicas, que removem o

fosfato de outras proteínas. Uma molécula protéica de quinase pode fosforilar várias centenas de proteínas alvo, e, portanto, amplificar em muito sinais fracos. A ativação de uma quinase está implicada em resposta a estresses abióticos, reguladores de crescimento, limitação de nutrientes e ataque de patógenos. Estudos sobre resistência de plantas à patógenos demonstram que fluxos de íons são pré-requisitos para a ativação de proteínas quinase de ativação mitótica específica (MAPK) e a geração de oxigênio reativo, que por sua vez, é responsável pela ativação de numerosos genes envolvidos na defesa da planta a patógenos. Uma quinase, identificada por He et al. (1999), mostrou envolvimento com a transdução de sinais na interação entre *M. grisea* e arroz, sugerindo um papel crucial desta classe de proteínas com relação à resistência. Considerando o fato de que a seqüência identificada através deste trabalho foi obtida a partir de cDNAs de arroz diferencialmente expressos quando submetidos ao fungo *M. grisea*, pode ser importante a futura avaliação do papel deste gene na defesa da planta a este patógeno.

5. CONCLUSÃO

Através da observação dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

O vetor pEGAD é capaz de direcionar a acumulação de EGFP e EGFP::cDNAs de arroz em estruturas celulares de plantas de *A. thaliana* transformadas via *A. tumefaciens*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, C.R. et al. Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. **Biotechnology Progress**, New York, v.14, p.350-354, 1998.

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.25, p.3389-3402, 1997.

ARAGÃO, F.J.L. et al. Metodologias para transformação genética em plantas Modelo. **Circular Técnica EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, v.1, n.15, p.1-5, 2002.

ARBER, W. Roots, strategies and prospects for functional genomics. **Current Science**, Bangalore, v.83, p.826-828, 2002.

ARENCIBIA A.D. et al. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research**, London, v.7, p.213-222, 1998.

BATRA, S.; KUMAR, S. *Agrobacterium*-mediated transient *GUS* gene expression in buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.). **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.44, p. 449-458, 2003.

BECHTOLD, N. et al. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v.316, 1194-1199, 1993.

BENT, A.F. *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. **Plant Physiology**, Lancaster, v.124, p.1540-1547, 2000.

BIRCH, R.G. Plant transformation: problems and strategies for practical application. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.48, 297-326, 1997.

BOWERS, J.E. Unraveling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. **Nature**, London, v.422, p.433-438, 2003.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: Courier, 2000. 1367p.

CHA, H.J. et al. Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: monitoring protein expression and solubility. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.67, p.565-574, 2000.

CHAE, H.J. et al. Framework for on-line optimization of recombinant protein expression in high cell density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.69, p.275-285, 2000.

CHALFIE, L. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, London, v.263, p.802-805, 1994.

CHEN, M. et al. An integrated physical and genetic map of the rice genome. **The Plant Cell**, Rockville, v.14, p.537-545, 2002.

CHENG, L. et al. Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, p.351-354, 1996.

CHENG, M. et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Lancaster, v.115, 971-980, 1997.

CHENG, X.Y. et al. *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry 1 Ab and cry 1 Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.2767-2772, 1998.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v.16, p.735-743, 1998.

CORMACK, B.P.; VALDIVIA, R.H.; FALKOW, S. FACS-Optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene**, Amsterdam, v.173, p.33-38, 1996.

CUTLER, S.R. et al. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at high frequency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.3718-3723, 2000.

DELBREIL, B.; GUERCHE, P.; JULLEIN, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. longterm embryogenic callus and regeneration of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.12, p.129-132, 1993.

DeLiSA, M.P. et al. Monitoring GFP-fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. **Biotechnology and Bioengineering**, Wiley, v.65, 54-64, 1999.

DELSENY, M. Towards an accurate sequence of the rice genome. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, p.101-105, 2003.

DESFEUX, C. et al. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.895-904, 2000.

ENRIQUEZ-OBREGON, G.A. et al. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. **Biología Aplicada: Revista de la Sociedad Iberoamericana para Investigaciones sobre Interferón y Biotecnología en Salud**, La Habana, v.14, p.169-174, 1998.

ESCOBAR, N.M. et al. High-throughput viral expression of cDNA-green fluorescent protein fusions reveals novel subcellular addresses and identifies unique proteins that interact with plasmodesmata. **The Plant cell**, Rockville, v.15, p.1507-1523, 2003.

FISCHER, K.S. et al. Collaborations in Rice. **Science**, London, v.290, p.279-280, 2000.

GALE, M.D.; DEVOS, K.M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.1971-1974, 1998.

GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. **Plant Molecular Biology Manual**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. 175p.

HANSEN, G.; WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants: problems and strategies for practical application. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.4, p.226-231, 1999.

HANSON, M., R.; KOHLER, R.H. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.529-539, 2001.

HARRIS, S.B. Virtual rice: Japan sets up the rice simulator project to create an *in silico* rice plant. **The EMBO Journal**, Einsham, v.3, p.511-513, 2002.

HASELOFF, J.; AMOS, B. GFP in plants. **Focus: Technical Cooperation**, Washington, v.11, p.1-2, 1995.

HE, C.; FONG, S.H.T.; YANG, D. et al. BWMK1, a novel MAP Kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.12, n.12, p.1064-1073, 1999.

HIEI, Y. et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal**, Oxford, v.2, p.271-282, 1994.

HIETER, P.; BOGUSKI, M. Functional genomics: it's all how you read it. **Science**, London, v.278, p.601-602, 1997.

ISHIDA, Y. et al. High efficiency of transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, 745-750, 1996.

IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.1, p.95-99, 1996.

JONES, J.J. et al. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.109, p.201-211, 2004.

KOROLEVA, O.A. et al. High-throughput protein localization in *Arabidopsis* using *Agrobacterium*-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. **The Plant Journal**, Oxford, v.41, p.162-174, 2005.

LABRA, M. et al. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.109, p.1512-1518, 2004.

LAMB, C.R.C. et al. Identificação de genes que conferem resistência de amplo espectro envolvidos na interação entre *Magnaporthe grisea* e arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4, REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26; 2005, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Orium, 2005. p.522-524.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.60, p.197-214, 1981.

LEWIS, S.; ASHBURNER, M.; REESE, M.G. Annotating eukaryote genomes. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v.10, p.349-354, 2000.

LU, B.R. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae). Historical perspective and current status. **International Rice Research Institute**, Los Baños, v.24, p.4-8, 1999.

MACLEAN, J.L. et al. **Rice Almanac**. Los Baños (Phillippines): International Rice Research Institute; Bouaké (Côte d'Ivoire): West Africa Rice Development Association; Cali (Colombia): International Center for Tropical Agriculture; Rome (Italy): Food and Agriculture Organization, 2002. pp. 253.

MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. et al. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.22, p.63-70, 2004.

MAY, G.D. et al. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Bio/technology Nature Publishing Company**, New York, v.13, p.486-492, 1995.

MISAWA, K. et al. A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.97, p.3062-3066, 2000.

MOORE, G. et al. Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**, London, v.5, p. 737-739, 1995.

MORIN, X. et al. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, p.15050-15055, 2001.

NAKAGAHARA, M.; OKUNO, K.; VAUGHAN, D. Rice genetic resources: history, conservation, investigate characterization and use in Japan. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.35, p.69-77, 1997.

OARD, S.V.; ENRIGHT, F.M. Expression of the antimicrobial peptides in plants to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.3, p.1-12, 2006.

RENSINK, W.A.; BUELL, C.R. Arabidopsis to rice. Applying knowledge from a weed to enhance our understanding of a crop species. **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, p.622-629, 2004.

ROUZÉ, P.; PAVY, N.; ROMBAUTS, S. Genome annotation: which tools do we have for it? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.2, p.90-95, 1999.

SASAKI, T. The rice genome project in Japan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.95, p.2027-2028, 1998.

SCHMIDT, R. Synteny: recent advances and future prospects. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, p.97-102, 2000.

SCHOOFF, H.; KARLOWSKI, W.M. Comparison of rice and *Arabidopsis* annotation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.6, p.106-112, 2003.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F.H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, Philadelphia, v.59, p.223-229, 1962.

SUZUKI, S. et al. Production of transgenic plants of the Liliaceous ornamental plant *Agapanthus praecox* spp. *orientalis* (Leighton) Leighton via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calli. **Plant Science**, Shannon, v.161, p.89-97, 2001.

TANAKA, N. et al. Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments. **Molecular Genetics and genomics**, Berlin, v.271, p.566–576, 2004.

TIAN, G.W. et al. High-throughput fluorescent tagging of full-length Arabidopsis gene products in planta. **Plant Physiology**, Lancaster, v.135, p.25-38, 2004.

TINGAY, S. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. **The Plant Journal**, Oxford, v.11, p.1369-1376, 1997.

TSIEN, R.Y. The green fluorescent protein. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.67, p.509-544, 1998.

TYAGI, A.K. et al. Structural and Functional Analysis of Rice Genome. **Journal of Genetics**, London, v.83, p.79-99, 2004.

TYAGI, A.K.; MOHANTY, A. Rice transformation for crop improvement and functional genomics. **Plant Science**, Shannon, v.158, p.1-18, 2000.

TZFIRA, T. et al. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.57, p.503-516, 2005.

WATANABE, Y. Genomic Constitution of genus *Oryzica*. Phylogeny and geographical distribution of genus *Oryzica*. **Science of the Rice Plant Genetics**, New York, v.3, p.29-68, 1997.

WATERHOUSE, P.M. Plant gene silencing applications. **The Plant journal: for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v.5, p.1-3, 2002.

WATERHOUSE, P.M.; HELLIWELL, C.A. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v.4, p.29-38, 2002.

YU, J. et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). **Science**, London, v.296, p.79-92, 2002.

ZIMMERMANN, T. et al. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.546, p.87-92, 2003.