

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



SELEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE GENETICAMENTE MODIFICADAS COM O CLONE DE UMA POTENCIAL V-ATPASE POR PCR E TESTE DE GERMINAÇÃO EM MEIO SELETIVO

GONZALEZ, Thairize Silva¹ ; **SILVEIRA, Carla Ferreira**^{2,4} ; **PAYASI, Anurag**^{1,2} ; **MELLO-FARIAS, Paulo Celso**¹ ; **OLIVEIRA, Denise C.**² ; **PETERS, José Antonio**³ ; **OLIVEIRA, Antonio Costa**² ; **CHAVES, Ana Lúcia Soares**¹ .

¹DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA – IQG/UFPEL CAMPUS UNIVERSITÁRIO – CAIXA POSTAL 354 – CEP 96010-900, CAPÃO DO LEÃO, RS, BRASIL. ALSCHAVES@YAHOO.COM.BR

²CENTRO DE GENÔMICA E FITOMELHORAMENTO – FAEM/UFPEL

³LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA/UFPEL

⁴PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – UFPEL

1. INTRODUÇÃO

A espécie vegetal tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) é considerada como modelo para estudos de genética clássica e molecular, por ser um diplóide simples que consiste de 12 pares de cromossomos (RICK; YODER, 1988) e possuir genoma relativamente pequeno (0,9 pg/genoma haplóide) (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991). Devido à sua importância econômica, o tomate tem sido usado como principal modelo para estudos da maturação de frutos. Esta importância prática, combinada com a facilidade de propagação, o curto ciclo de vida e a possibilidade de cultivo durante o ano todo em casa de vegetação, fez do tomate o modelo vegetal mais utilizado para a pesquisa do desenvolvimento e maturação de frutos (GIOVANNONI, 2001; CHAVES; MELLO-FARIAS, 2006).

COM A FINALIDADE DE OBTER INFORMAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DE TOMATE EM NÍVEL MOLECULAR, VÁRIOS GENES EXPRESSOS DURANTE O PERÍODO DE DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO FORAM ISOLADOS (JONES *ET AL.*, 1999, 2001A) E ENTRE ELES ESTÁ *LEVATPASE1*. A ANÁLISE DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA REVELOU ALTA IDENTIDADE COM APROXIMADAMENTE 50 V-ATPASES DE VÁRIAS ESPÉCIES VEGETAIS, INDICANDO QUE *LEVATPASE1* CORRESPONDE POTENCIALMENTE A UMA SUB-UNIDADE C PROTEOLIPÍDICA DE UMA V-ATPASE DE TOMATE (CHAVES *ET AL.*, 2002). OUTRAS V-ATPASES FORAM ESTUDADAS EM TOMATE, MAS CORRESPONDEM A ISOFORMAS ISOLADAS EM SEMENTES (COOLEY *ET AL.*, 2009) OU A OUTRAS SUB-UNIDADES QUE COMPÕEM O COMPLEXO MULTITENZIMÁTICO, TAIS COMO AS SUB-UNIDADES A, E E F (JEFFREY *ET AL.*, 2003; TSUYOSHI *ET AL.*, 2006).

O termo V-ATPase se refere à todas as bombas de prótons que compartilham características bioquímicas e moleculares, apesar de sua verdadeira localização membranar (STEVENS; FORGAC, 1997; SZE *et al.*, 1999). Estas proteínas são responsáveis pela acidificação dos vacúolos e dos compartimentos formados por endomembranas, essencial para diversas funções celulares em eucariotos, incluindo o

acúmulo e o armazenamento de íons e metabólitos, a homeostase citoplasmática, a regulação osmótica, a regulação e manutenção do turgor celular, o controle do pH e o endereçamento de proteínas (KLIONSKY *et al.*, 1990; SZE *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1998; MATSUOKA *et al.*, 1997; MARTY, 1999; SZE *et al.*, 1999).

A fim de comprovar definitivamente que *LeVATPase1* codifica a subunidade c do referido complexo protéico, procedeu-se à transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*, com o referido clone em orientação *sense* (S) e *antisense* (AS), seguindo-se o protocolo descrito por McCORMICK *et al.* (1986).

O PRESENTE TRABALHO TEVE COMO OBJETIVO A SELEÇÃO DAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS MENCIONADAS ACIMA, BEM COMO A IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS HOMOZIGOTAS, PARA QUE POSSAM SER UTILIZADAS EM ENSAIOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES POSTERIORES, OS QUAIS SERVIRÃO PARA APROXIMAÇÃO DA FUNÇÃO *IN VIVO* DE LEVATPASE1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A SELEÇÃO DAS PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS COM CLONE *LEVATPASE1* EM ORIENTAÇÃO *SENSE* (S) E *ANTISENSE* (AS) FOI REALIZADA PRIMEIRAMENTE POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) E A SELEÇÃO DAS LINHAGENS HOMOZIGOTAS, POR TESTE DE GERMINAÇÃO EM MEIO DE CULTURA SELETIVO.

PARA A REALIZAÇÃO DA PCR, FOI EXTRAÍDO DNA GENÔMICO FOLIAR DOS TOMATEIROS A SEREM TESTADOS, PELO MÉTODO DO CTAB/FENOL-CLOROFÓRMIO, SENDO A QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA ÓTICA. NESTA ETAPA VISOU-SE A A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CORRESPONDENTES À NEOMICINA FOSFOTRANSFERASE II (*NPT II*), QUE CONFERE RESISTÊNCIA AO ANTIBIÓTICO CANAMICINA, COMUMENTE UTILIZADO COMO GENE MARCADOR EM TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS, E A UMA UBIQUITINA DE TOMATE (*UBI3*), COMO CONTROLE POSITIVO DA REAÇÃO. A PCR FOI REALIZADA UTILIZANDO 20 NG DE DNA COMO MOLDE E COM OLIGONUCLEOTÍDEOS CORRESPONDENTES A *NPTII* E *UBI3*, EM 30 CICLOS DE 45S A 95°C, 1MIN A 62°C, 45S A 72°C E 1 CICLO DE 5MIN A 72°C. FORAM CONSIDERADAS POSITIVAS (PLANTAS TRANSFORMADAS) AQUELAS CORRESPONDENTES ÀS AMOSTRAS PARA AS QUAIS SE OBTVEVE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS PARA OS GENES *NPTII* E *UBI3*.

A seleção das linhagens homozigotas foi realizada através de teste de germinação das sementes extraídas de plantas cujo resultados da amplificação foi verificado como positivo. As sementes oriundas de cada fruto dos tomateiros transformados foram extraídas e desinfestadas, em banco de fluxo laminar equipado com lâmpada de U.V (Horizontal Clean Bench), com adição de álcool 70%, água destilada autoclavada e hipoclorito de sódio 50% (v:v), e semeadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo o antibiótico canamicina na concentração de 50µg/L. Este antibiótico foi utilizado, pois concomitantemente à inserção do gene de interesse, houve também a introdução de *nptII* (neomicina fosfotransferase II), gene que codifica a proteína capaz de degradá-lo.

APÓS A SEMEADURA OS FRASCOS FORAM LEVADOS PARA A SALA DE CRESCIMENTO, QUE POSSUI TEMPERATURA, FOTOPERÍODO E DENSIDADE DE FLUXO DE FÓTONS FOTOSSINTETICAMENTE ATIVOS CONTROLADOS. FOI AVALIADA A PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO PARA CADA GRUPO DE SEMENTES REPRESENTATIVAS DE FRUTOS INDIVIDUALIZADOS. ÀS LINHAGENS HOMOZIGOTAS FORAM COLOCADAS EM CASA DE VEGETAÇÃO, PARA POSTERIOR UTILIZAÇÃO EM ENSAIOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

OS RESULTADOS DA AMPLIFICAÇÃO POR PCR PODEM SER OBSERVADOS NA FIGURA 1. PARA AS AMOSTRAS DE DNA DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS, FORAM OBTIDOS

PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO (FRAGMENTOS) CORRESPONDENTES AOS DOIS GENES TESTADOS (*NPTII* E *UBI3*), COMPROVANDO A INSERÇÃO DO GENE DE INTERESSE (*LeVATPase1*) INDIRETAMENTE ATRAVÉS DA PRESENÇA DE *NPTII*.

PÔDE-SE OBSERVAR, AINDA, QUE NAS AMOSTRAS CORRESPONDENTES A PLANTAS TESTEMUNHAS SÓ OCORREU AMPLIFICAÇÃO DE *UBI3*, O QUE ERA ESPERADO, VISTO QUE ESTAS PLANTAS NÃO SOFRERAM O PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA. O MESMO RESULTADO FOI OBTIDO PARA PLANTAS SUBMETIDAS AO PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MAS QUE, CONTUDO, ESTE NÃO FOI BEM SUCEDIDO (RESULTADOS NÃO MOSTRADOS), SENDO ESTES EVENTOS DESCARTADOS.



Figura 1. Produtos da amplificação dos genes *ubi3* e *nptII* em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). AS - planta geneticamente modificada com o clone *LeVATPase1* em orientação *antisense*; Test - planta testemunha; S - planta geneticamente modificada com o clone *LeVATPase1* em orientação *sense*.

Para o teste de germinação em meio de cultura seletivo, foram consideradas linhagens homozigotas os eventos de transformação em que se obteve 100% de plantas resistentes ao antibiótico, a partir da germinação de sementes oriundas de um único fruto.

A avaliação da resistência ou suscetibilidade das plantas testadas ao antibiótico presente no meio de cultura (canamicina) foi feita visualmente. Para tanto, foram considerados aspectos como o desenvolvimento de raízes e folhas e desenvolvimento da planta de forma geral (Figura 2). No caso de indivíduos heterozigotos, essa taxa de resistência ao antibiótico não é de 100%, e varia de acordo com o número de cópias do transgene inseridas.



Figura 2. Planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) resistente (esquerda) e sensível (direita) ao antibiótico canamicina.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que a técnica de PCR pôde ser empregada com sucesso para a seleção de plantas de tomate geneticamente modificadas com o clone *LeVATPase1* e que o teste de germinação em meio seletivo com o antibiótico canamicina foi efetivo para a seleção das linhagens homozigotas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, 9:208-218, 1991.
- CHAVES, A.; PECH, J.C.; LATCHE, A.; BOUZAYEN, M.; ZEGZOUTI, H.; ROMBALDI, C. V. CHARACTERISATION OF ER49, A TS TYPE PROTEIN SYNTHESIS ELONGATION FACTOR, EXPRESSED DURING TOMATO FRUIT MATURATION. **PLANT PHYSIOLOGY**, 14:21-30, 2002.
- CHAVES, A; MELLO-FARIAS, P. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. **Genetics and Molecular Biology**. 29,3: 508-515, 2006.
- GIOVANNONI, J. J. MOLECULAR BIOLOGY OF FRUIT MATURATION AND RIPENING. **ANNUAL REVIEW OF PLANT PHYSIOLOGY AND PLANT MOLECULAR BIOLOGY**, 52:725-749, 2001.
- JEFFREY, S.; JONES, D.; DAVIES, E. Identification, Conservation and relative Expression

of V-ATPase cDNAs in Tomato Plant. **Plant Molecular Biology**. 21:145-158, 2003.

JONES, B. J.; ZEGZOUTI, H.; FRASSE, P.; BOUZAYEN, M. ISOLATION OF DEVELOPMENTALLY REGULATED GENES IN IMMATURE TOMATO FRUIT: TOWARDS UNDERSTANDING OF PRE-RIPENING DEVELOPMENT. **BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY OF THE PLANT HORMONE ETHYLENE**, NETHERLANDS, KLUWER ACADEMIC PRESS, 1999. P. 181-182.

JONES, B.; FRASSE, P.; OLMOS, E.; LECLERCQ, J.; TOURNIER, B.; ZEGZOUTI, H.; LATCHE, A.; PECH, J-C.; BOUZAYEN, M. Differential ethylene regulation of tomato ARF and Aux/IAA homologs defines a novel point of interaction between auxin and ethylene. **Plant Molecular Biology**, 2001a (submitted).

KLIONSKY, D. J.; HERMAN, P. K.; EMR, S. D. THE FUNGAL VACUOLE: COMPOSITION, FUNCTION AND BIOGENESIS. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, 54:266-292, 1990.

LI, X.; HSU, H. T.; SU, R. T.; SZE, H. The molecular chaperone calnexin associates with the vacuolar H⁺ATPase from oat seedling. **Plant Cell**, 10:119-130, 1998.

MARTY, F. PLANT VACUOLES. **PLANT CELL**, 11:587-599, 1999.

MATSUOKA, K.; HIGUCHI, T.; MAESHIMA, M.; NAKAMURA, K. A vacuolar type H⁺ATPase in a non vacuolar organelle is required for sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. **Plant Cell**, 9:533-546, 1997.

MCCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, n. 15, p. 473-479, 1962.

RICK, C. M.; YODER, J. I. CLASSICAL AND MOLECULAR GENETICS OF TOMATO: HIGHLIGHTS AND PERSPECTIVES. **ANNUAL REVIEW OF GENETICS**, 22:281-300, 1988.

STEVENS, T. H.; FORGAC, M. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺ATPase. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, 13:779-808, 1997.

SZE, H.; WARD, J. M.; LAI, S. VACUOLAR H⁺ATPASES FROM PLANTS. **JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES**, 24:371-381, 1992.

SZE, H.; LI, X.; PALMGREN, M. G. Energization of plant cell membranes by H⁺pumping ATPases: regulation and biosynthesis. **Plant Cell**, 11:677-689, 1999.

TSUYOSHI, A.; KANAYAMA, Y.; YAMAKI, S.; YAMADA, K.; SHIRATAKE, K. FRUIT SPECIFIC V-ATPASE SUPPRESSION IN ANTISENSE-TRANSGENIC TOMATO REDUCES FRUIT GROWTH AND SEED FORMATION. **PLANTA**, 223(6): 1272-1280, 2006.