

TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM TABACOS TRANSFORMADOS COM OS GENES DE CITRATO SINTASE DE PLANTA E BACTÉRIA REGULADA POR PROMOTORES ESPECÍFICOS DE RAIZ E CONSTITUTIVO

N.P. CARNEIRO, A.A. CARNEIRO, E. PAIVA, G.M. CANÇADO, V.M.C. ALVES, C.L. BELELE, e A.A.C. PURCINO.

NBA - Núcleo de Biologia Aplicada / Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA/CNPMS – Caixa Postal 151 – Rodovia MG 424, Km 65, Sete Lagoas, MG 36701-970 - cnpms@cnpms.embrapa.br

Palavras chaves: tolerância ao Al, planta transgênica, citrato sintase

INTRODUÇÃO

Alumínio (Al) é o metal mais abundante da crosta terrestre e sua toxicidade é um fator limitante para as plantas cultivadas em solos ácidos. O sintoma mais facilmente reconhecido na toxicidade de Al é a inibição do crescimento da raiz e esse tem sido o método mais aceitável da medida do estresse do Al em plantas. Estratégias desenhadas para resolver esse problema incluem a calagem (aumento do pH) do solo e o uso de plantas tolerantes a solos ácidos. Um dos mecanismos mais acetáveis de plantas tolerância ao Al é o aumento da liberação pela raiz de ácidos orgânicos que quelam Al do lado externo da membrana plasmática prevenindo sua absorção. Fuente et al (1997) superexpressou o gene da citrato sintase (CS) de *Pseudomonas aeruginosa* em tabaco e mamão usando o promotor constitutivo CAMV35S. O gene de bactéria CS foi direcionado para o citoplasma em vez da mitocôndria para evitar redistribuição de carbono da síntese de citrato para para outros componentes do ciclo de Krebs. Esses resultados demonstraram que a superexpressão de CS conferiu as plantas de tabaco e mamão tolerância a Al. O objetivo desse trabalho foi de isolar e clonar no vetor binário os genes CS de bactéria (*Escherichia coli*) e de planta (*Daucus carota*) sob o controle dos promotores CAMV35 e específico de raiz.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os genes CS de *Daucus carota* com e sem o peptídeo sinal de mitocôndria foram isolados por RT-PCR. O gene CS de *Escherichia coli* foi isolado por PCR de DNA genômico. A posição relativa dos primers do gene CS estão mostrados na Figura 1. O promotor CAMV35S e o sítio de poliadenilação NOS foram isolados do plasmídeo pCAMBIA por PCR. O promotor específico de raiz ToRB7 (S45406) foi isolado de DNA genômico de tabaco por PCR. Os primers de todas as reações foram desenhados para ter sítios de enzima de restrição nas extremidades para facilitar a clonagem dos fragmentos de PCR no vetor binário. Todos os fragmentos de PCR foram clonados primeiro no vetor pTA (Invitrogen, CA, USA). Os plasmídeos recombinantes pTA foram clivados com enzima de restrição e os insertos purificados usando o kit Qiaquick Gel Extraction (Qiagen, CA, USA). Os insertos purificados foram ligados no plasmídeo pCAMBIA digerido com a mesma enzima usada para o plasmídeo recombinante pTA. Seleções com IPTG, X-gal e kanamicina foram usadas para identificar os plasmídios pCAMBIA recombinantes contendo o primeiro inserto. Hibridizações de colônias foram usadas para identificar o segundo e terceiros fragmentos no plasmídeo pCAMBIA recombinante. A presença dos insertos corretos foram confirmadas por sequenciamento usando o sequenciador automático ABI-PRISM 377 DNA Sequencer -

Perkin Elmer. As construções gênicas estão mostradas na Figure 3.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A excreção de ácido cítrico é um dos mecanismos de tolerância de plantas ao Al tóxico. Fuente *et al* (1997) demonstraram que plantas de tabaco e mamão transformadas com o gene de citrato sintase de *Pseudomonas aeruginosa* excretavam 10 vezes mais ácido cítrico no citoplasma e excluíaam 4 vezes mais Al que plantas não transformadas. Nesse trabalho, nós isolamos e clonamos três diferentes genes de CS (dois de planta e um de bactéria) para comparar os efeitos dessas construções em plantas transgênicas de tabaco. A estratégia usada nesse trabalho foi de isolar genes e promotores por PCR. Sítios de enzima de restrição foram adicionados nos finais do primers para facilitar clonagem no vetor binário de plantas. A clonagem de insertos (genes e promotores) no vetor pTA antes da clonagem no plasmídeo pCAMBIA foi usada para demonstrar que fragmentos de PCR tinham sido clivados por enzima de restrição. Esse passo adicional foi também feito para adicionar sítios de enzima de restrição nos fragmentos de PCR. Essa estratégia foi usada para clonar o promotor CAMV35S no sitio EcoRI do plasmídeo pCAMBIA. As seqüências para desenhar os primers foram baseadas em seqüências depositadas no GeneBank e os sítios de restrição dos primers foram baseadas no sitio polilinker do pCAMBIA e na seqüência dos genes e promotores. A clonagem dos insertos foram confirmadas pela tamanho do fragmento nos plasmídios recombinantes clivados com enzimas de restrição (Fig. 3) e seqüenciamento. Foram usadas plantas transformadas com essas construções para comparar a tolerância no Al (Fig. 4). A secreção de ácido cítrico será quantificada por HPLC e a exclusão de íons de Al por hematoxilina. Novas construções contendo o gene da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* estão sendo usadas como controle positivo.

FUENTE, J.M. de la, ; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L.J. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthase. **Science**, Washington, v.27, p.1566-1568, 1997.

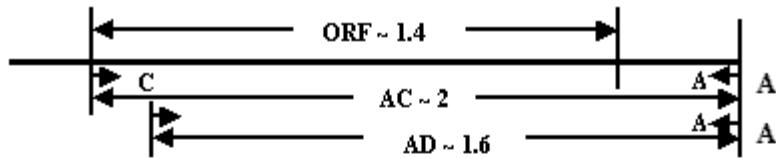


Figura 1 - Posição relativa dos primers da citrato sintase de *Dauca carota* e tamanho em kilobases das seqüências AC e AD.

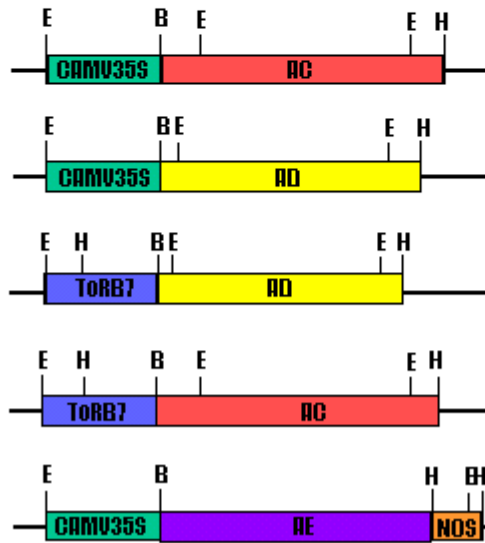


Figura 2 - A: Mapa do plasmídio pCAMBIA C2 (1303); B: Construção gênica CS; Promotores CAMV35S e ToRB7; AC: CS de *Dauca carota* com peptídeo sinal de mitocondria; AD: CS de *Dauca carota* sem peptídeo sinal de mitocondria; AE: CS de *Escherichia coli*; NOS: Sítio de poliadenilação NOS; E: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII

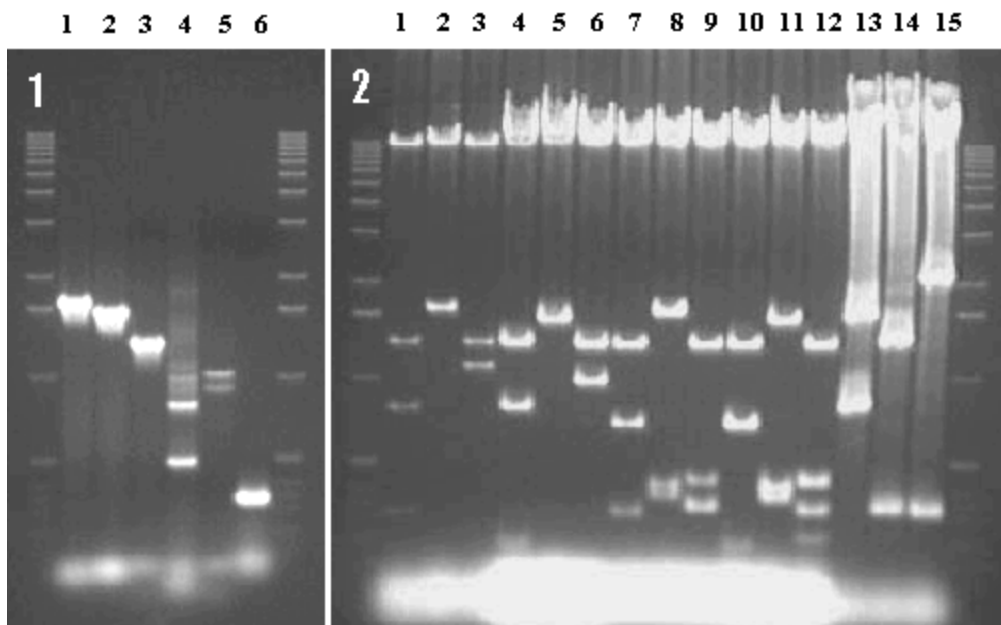


Figura 3 – 1: AC: Reação de PCR do gene CS de *Dauca carota* CS com peptídeo sinal (1); AD sem peptídeo sinal (2); AE *E. coli* CS (3); CAMV35S (4) e ToRB7 (5) são os promotores; Sítio de poliadenilação NOS (6).

Figura 3 -2: Padrão de enzima de restrição de várias construções gênicas; C2 35S AC (1, 2 e 3); C2 35S AD (4, 5 e 6); ToRB7 AC (7, 8 e 9); ToRB7 AD (10; 11 e 12); C2 35S AE (13, 14 e 15) clivados com E: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII.

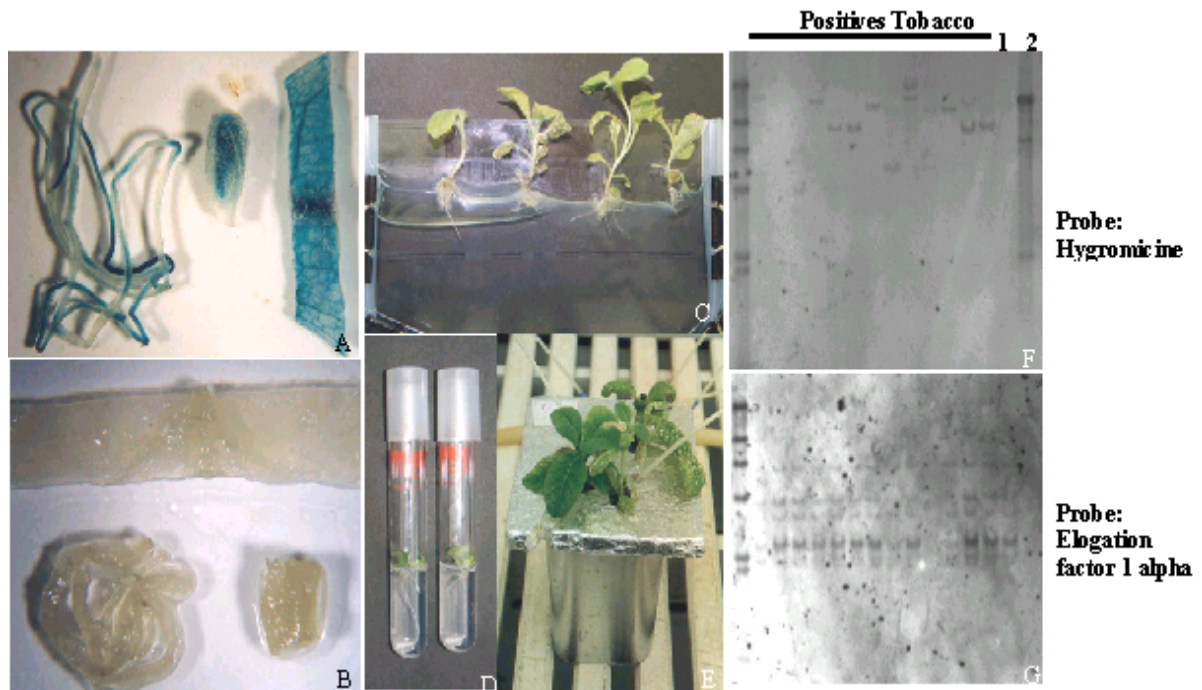


Figura 4 - Atividade do GUS in plantas transgênicas de tabaco (A); Plantas de tabaco transformadas (B); Gradiente de Al (0 and 6 ppm) Placa (C);, Tubo (D); Plantas transgênicas de tabaco crescendo em 6 ppm em teste de hematoxilina (E); Southern blot de algumas plantas transformadas; F (sonda higromicina), G (sonda factor de elongamento 1 alfa); Planta controle negativo (1) e plasmídeo contendo construção gênica (2).