

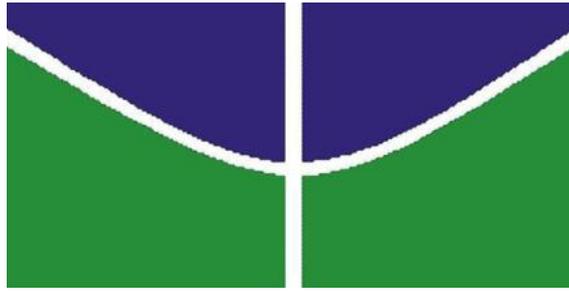


Universidade de Brasília - UnB
Instituto de Biologia
Departamento de Botânica

Transformação genética de *Arabidopsis thaliana* L. via *Agrobacterium tumefaciens*
com os genes da família geranyl geranyl difosfato e associação com efeito alelopático
em Gergelim (*Sesamum indicum* L.).

Juliane Laner de Toledo

Brasília – DF
Setembro, 2013.



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Biologia

Departamento de Botânica

Transformação genética de *Arabidopsis thaliana* L. via *Agrobacterium tumefaciens* com os genes da família geranyl geranyl difosfato e associação com efeito alelopático em Gergelim (*Sesamum indicum*).

Juliane Laner de Toledo

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF
Setembro, 2013.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que eu chegasse até aqui. Agradeço em especial:

Ao Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira pela confiança, orientação, paciência nos momentos de angústia e acima de tudo por toda a contribuição intelectual para que esse trabalho saísse do papel. Obrigada pela oportunidade de trabalhar nessa área tão interessante e por todo o apoio e paciência dedicado ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Tatsuya Nagata por toda ajuda intelectual oferecida, por ter nos cedido o espaço, equipamentos e materiais necessários e acima de tudo pelo apoio nos momentos difíceis e pela resposta a todos os questionamentos. Obrigada por tudo, trabalhar com o Senhor foi um enorme aprendizado. Sem sua ajuda dificilmente não seria possível a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo por todas as dicas e pelo acompanhamento em todas as etapas do trabalho.

À Prof. Dra. Vera Carneiro pelo espaço cedido na Embrapa Cenargen além do auxílio na obtenção das sementes que deram início ao trabalho.

À Dra. Virgínia Carla de Oliveira por todo o seu apoio, pela indicação do Prof. Tatsuya, pela ajuda que dispendeu até o fim deste trabalho. Muito obrigada por responder sempre aos meus e-mails e principalmente por ser essa pessoa meiga e dedicada, que se tornou muito querida nessa minha jornada.

Às queridas alunas do laboratório de Virologia Vegetal Bruna Junqueira e Kelly pelo tempo precioso que dispuseram a minha disponibilidade. A ajuda de vocês foi fundamental.

À Msc. Lilian Hasegawa, analista do laboratório de apomixia da Embrapa Cenargen pela ajuda em algumas etapas do trabalho.

A equipe do laboratório de Biologia Molecular de Plantas: Dra. Michelle Fayad, Msc. Renata Cristina e demais estagiários que em algum momento estiveram conosco. Jamais esquecerei a ajuda e os conselhos. São mais que colegas, são amigos.

A equipe do Laboratório de Termobiologia, em especial à Anabele Gomes e ao Nicolas por todo o auxílio na montagem e desmontagem dos bioensaios, além dos conselhos e amizade dispendida ao longo do trabalho.

Às grandes amigas Renata Cristina e Anabele Gomes. Foram inesquecíveis os momentos que passei com vocês!

Aos companheiros e amigos da sala de estudos Raíssa Leite, Ludmila Gondim, Reneida Mendes, Fernanda Barbosa, Jéssika Vieira, Mayco Werllen, Patrícia Monah, Estevão, Bruno Edson, Duda, Daiane e William. Obrigada a todos pelos bons momentos, pelas risadas, pelos almoços juntos e pela amizade.

À minha grande amiga, que eu conheci durante essa caminhada, Patrícia Justo Kleinhans por toda ajuda durante a realização de boa parte do trabalho, mas principalmente pela amizade que levarei para o resto da vida. Obrigada minha amiga por tudo! “O mestrado já valeu a pena”.

Agradeço, em especial, ao meu esposo Eduardo e ao meu filho Bruno. Vocês dois foram os grandes pilares dessa vitória. Sem vocês eu não teria conseguido! Obrigada por todos os momentos de carinho, de apoio, de amor! Obrigada por todo o incentivo que sempre me deram, por entenderem os meus momentos de ausência e acima de tudo, obrigada por estarem ao meu lado sempre e fazerem minha vida mais feliz.

Aos meus pais Júlio César e Jacinta agradeço à vida, ao amor e principalmente a educação. Sempre me incentivando a continuar e buscar os meus sonhos. Se não fossem vocês dois certamente eu não estaria aqui.

A todo o corpo docente do Departamento de Botânica da UnB e a CAPES pela bolsa concedida nesses dois anos de estudo.

A Deus, pelo dom da vida e do amor!

Meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

TABELA DE CONTEÚDO

AGRADECIMENTOS	3
TABELA DE CONTEÚDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Superexpressão gênica	15
1.2. Transformações em plantas	16
1.3. Transformação via <i>A. tumefaciens</i>	16
1.4. Organismos modelo	17
1.4.1. Biologia de <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	17
1.5. Metabólitos secundários	20
1.6. Terpenóides	22
1.7. Terpenóides em <i>Arabidopsis</i>	25
1.8. Geranyl geranyl difosfato	27
1.9. Compostos alelopáticos	27
1.10. <i>Sesamum indicum</i> L. (Gergelim)	28
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1. Objetivos Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Crescimento das plantas	30
3.2. Aquisição de plasmídeos contendo os genes de interesse.	30
3.3. Transformação em <i>A. tumefaciens</i>	31
3.4. Transformação de <i>A. thaliana</i> e seleção das plantas transformadas	32
3.5. Confirmação da transgenia	34
3.6. PCR em tempo real – quantificação absoluta em plantas transgênicas	34
3.7. Testes de atividade Biológica com gergelim (<i>Sesamum indicum</i>)	35
3.8. Análise estatística	37

4. RESULTADOS	37
4.1. Sequenciamento do DNA plasmidial	37
4.2. Seleção de plantas transformadas	37
4.3. Confirmação da integração dos transgenes	38
4.4. PCR em tempo real absoluto	39
4.4.1 Comparação de cts (<i>Cycle Threshold</i>) de DNA plasmidial com plantas transgênicas	41
4.5. Inibição de crescimento do gergelim na presença de extrato foliar aquoso de <i>A. thaliana</i> .	45
5. DISCUSSÃO	56
5.1 Estudos de Expressão dos genes GGR, GGPS2 e GGPS6 em <i>A. thaliana</i> .	56
5.2 Efeito do extrato aquoso de <i>A. thaliana</i> sobre plântulas <i>Sesamum indicum</i> (Gergelim).	58
6. PLANO DE PUBLICAÇÃO	62
7. ANEXOS	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Vista geral da planta de *Arabidopsis thaliana*. A) Estado vegetativo de *Arabidopsis thaliana* evidenciando desde o aparecimento dos cotilédones até o final da formação da roseta, onde cessam a formação de novas folhas. B) Planta adulta em estágio de floração. C) Flor em padrão de espiral. D) Estames. E) Sementes. Barras de escala = 1 mm. Modificado de *The Jean-Pierre Bourgin Institute*, 2012. _____ 20
- Figura 2. Esquema da síntese dos terpenóides a partir da condensação de isopentenil difosfato (IDP) e seu isômero dimetalil difosfato (DMAPP). Fonte: Bohlmann et al., 1998. _____ 24
- Figura 3. Esquema da síntese dos precursores IPP e DMAPP pela via do mevalonato no citoplasma ou pela via do 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP). Fonte: Bohlmann et al., 1998. _____ 25
- Figura 4. Vista geral de planta jovem de *Arabidopsis thaliana* L. A) Plantas jovens cultivadas em BOD com 22 dias de cultivo em sua fase vegetativa. B) Vista aproximada de uma planta de *Arabidopsis*. A imagem mostra as folhas em forma de roseta, originadas do sistema apical caulinar. As barras representam 1 cm. _____ 30
- Figura 5. Técnica de mergulho floral. Flores de plantas de *Arabidopsis* foram colocadas em solução de sacarose 5% com o surfactante Silwet – L77 0,05%, misturadas ao meio de agrobacterium contendo gene de interesse para transformação. Laboratório de Apomixia – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). A barra representa 1 cm. _____ 33
- Figura 6. Plântulas de Gergelim crescidas sobre extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana*: A) Plântulas de gergelim germinadas em placas de Petri com solução aquosa, após seis dias da montagem do bioensaio. B) Plântulas dos diferentes tratamentos (3,0; 1,5 e 0,75%) colocadas em placa de vidro para medição com paquímetro digital. Barras de escala = 1cm. _____ 36
- Figura 7. Placa contendo meio MS e o antibiótico gentamicina para seleção de plantas transgênicas contendo o gene GGR. A plântula com folhas verdes indica resistência a gentamicina. Em contraste, existem plântulas que não se desenvolveram que tinham aspecto esbranquiçado, portanto, não resistentes à gentamicina. Barra de escala = 1cm. _____ 38
- Figura 8. Avaliação de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose: PCR com as amostras das plantas testadas para confirmação da presença do fragmento GGR nas amostras das plantas selecionadas. As bandas que apareceram foram o controle positivo e as amostras: 4GA, 4GB, 4GC, 4GD, 4GM (Todas apresentando tamanho de 250pb). As amostras 4GN e 4G4 não foram confirmadas como transgênicas. C+ = controle positivo (DNA plasmidial); C- = controle negativos (cDNA planta selvagem). M = Ladder 1Kb 250pb. Os primers utilizados foram o PYL436 Fw e o GGR rev. _____ 39
- Figura 9. Curva-padrão para o gene GGPS2. Azul: Número de cópias e valores de *cycle threshold* (ct) das diluições 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 Vermelho: Número de cópias do cDNA (utilizado como controle para obtenção de curva-padrão com uso de DNA Plasmidial) _____ 40

- Figura 10. Curva padrão para o gene GGPS6. Azul: Número de cópias das diluições 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 . Vermelho: Número de cópias do cDNA (Extraído da planta selvagem para ser utilizado como controle para obtenção de curva-padrão com uso de DNA plasmidial). _____ 41
- Figura 11. Comparação de ct de DNA plasmidial com ct das amostras das linhagens transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. O gráfico representa os valores de ct do controle (DNA plasmidial) e o ct das amostras transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. Todas as amostras participaram da mesma corrida de PCR em tempo real. _____ 43
- Figura 12. Comparação do Número de cópias do Gene GGR do DNA plasmidial com as amostras das linhagens transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. O gráfico representa o número de cópias do controle (DNA plasmidial) e o número de cópias do gene GGR das amostras transgênicas 4GA, 4GB e 4GC de arábida (22 dias) obtidas na mesma corrida de PCR em tempo real. _____ 43
- Figura 13. Comparação de ct de DNA plasmidial com ct das amostras das linhagens transgênicas 4GD e 4GM. O gráfico representa os valores de ct obtidos através de PCR em tempo real da amostra controle (DNA plasmidial) e das amostras transgênicas 4GD e 4GM. Todos os valores foram obtidos na mesma corrida. ____ 44
- Figura 14. Comparação do número de cópias do gene GGR do DNA plasmidial com as amostras das linhagens transgênicas 4GD e 4GM. O gráfico representa o número de cópias do gene GGR do controle (DNA plasmidial) e das amostras 4GD e 4GM de arábida (22 dias). Todos os valores são referentes a mesma corrida de PCR em tempo real. _____ 44
- Figura 15. Plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas por 6 dias em três concentrações (0,75%, 1,5% e 3,0%) de extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana* L. não-transformada comparadas com o controle (água). As plântulas de gergelim crescidas em extrato aquoso de arábida não-transformada tiveram o seu crescimento inibido. _____ 46
- Figura 16. Plântulas de *Sesamum indicum* L. (gergelim) crescidas na ausência e presença do extrato aquoso de plantas não-transformadas de *Arabidopsis thaliana* L. A: Plântulas de gergelim crescidas em água (controle positivo). As plântulas cresceram normalmente. B: Plântulas de gergelim crescidas em extrato aquoso de arábida não-transformado diluído a 0,75%. As plântulas de gergelim mostraram um menor crescimento e apresentaram uma tendência de gravitropismo negativo no crescimento da raiz. A barra representa 1cm. _____ 46
- Figura 17. Efeito do extrato aquoso foliar de *Arabidopsis thaliana* L. não-transformado no crescimento de *Sesamum indicum* L. O extrato foliar inibiu tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com o controle positivo (água). _____ 47
- Figura 18. Plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas na presença e ausência dos extratos aquosos de plantas de *Arabidopsis thaliana* não-transformada e transformada da linhagem 4GA. O efeito dos diferentes extratos sobre o crescimento de gergelim nas concentrações 1,5% e 0,75%. O efeito inibitório dos extratos da linhagem 4GA foi claramente maior que aquele observado nas plântulas de gergelim crescidas em extrato de arábida não-transformado. _____ 48
- Figura 19. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em duas concentrações (1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GA e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem.

Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GA inibiu mais tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de nível de significancia. _____ 49

Figura 20. Plântulas de *Sesamum indicum* L. crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana* transformada da linhagem 4GB. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GB diluído a 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento menor do que as plantas controles. _____ 50

Figura 21. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em duas concentrações (1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GB e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GB inibiu mais tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de nível de significancia. _____ 50

Figura 22. Plântulas de *Sesamum indicum* L. crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana* transformada da linhagem 4GC. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GC diluído a 3%; 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento diferente das plantas controles. _____ 51

Figura 23. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em três concentrações (3; 1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GC e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GC inibiu mais o crescimento da parte radicular do que o crescimento aéreo quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de nível de significancia. _____ 52

Figura 24. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em na concentração 0,75% do extrato aquoso da amostra 4GD e do Gergelim germinado na mesma concentração do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GD inibiu tanto o crescimento da parte radicular quanto aéreo quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de nível de significancia. _____ 52

Figura 25. Plântulas de *Sesamum indicum* L. crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana* transformada da linhagem 4GM. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GM diluído a 3%; 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento diferente das plantas controles. _____ 53

Figura 26. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado nas concentrações 3; 1,5 e 0,75% do extrato aquoso da amostra 4GM e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GM inibiu tanto o

crescimento da parte radicular quanto aéreo das inibições 3 e 1,5% quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de nível de significancia._____ 54

Figura 27. Tempo médio de germinação das sementes crescidas sobre extrato aquoso das amostras transgênicas 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM e água como controle. Houve um aumento no tempo de germinação das sementes sobre os extratos das plantas transgênicas em comparação com as sementes que cresceram sob a água. 55

ABREVIATURAS

IDP – Isopentenil Difosfato

DMAPP – Dimetalil Difosfato

GPP – Geranil Difosfato

FPP – Farnesil Difosfato

GGPP – Geranil Geranil Difosfato

TPS – Síntese de Terpenóides

GGR – Geranil Geranil Disfosfato Sintase

GGPS2 – Geranil Geranil Pirofosfatase Sintase 2

GGPS6 – Geranil Geranil Pirofosfatase Sintase 6

MEP – 2-C-Metil-D-Eritrol 4-Fosfato

MVA – Ácido Mevalônico

G1 – GGPS6

G2 – GGPS2

G4 – GGR

RESUMO

Alguns genes estão sempre expressos nas células, como é o caso dos genes constitutivos, outros estão sujeitos à regulação e são ativados somente quando a célula requisita seus produtos. A introdução de genes em plantas ou células vegetais permite a alteração dos níveis de expressão de genes envolvidos nas rotas metabólicas que se deseja estudar. Além disso, as alterações nos níveis de expressão gênica permitem estudar funcionalidade de genes, bem como obter um maior entendimento das vias biossintéticas em seus aspectos regulatórios. Assim, o presente trabalho teve como objetivo superexpressar e estudar a associação dos genes da geranyl geranyl difosfato sintase (GGPS), responsável pela síntese do precursor de terpenóides, com compostos alelopáticos em *Arabidopsis thaliana* L. Os terpenóides constituem umas das classes mais diversificadas de metabólitos secundários e desempenham funções na planta como reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal, além de estarem associados em interações da planta com o ambiente. Adicionalmente, os terpenos também têm sido encontrados em compostos alelopáticos. Em *Arabidopsis*, o gene GGPS possui múltiplas cópias, entre elas, GGR, GGPS2 e GGPS6. Neste estudo, os vetores foram adquiridos através de um banco de genes de *A. thaliana*. Esses plasmídeos foram transferidos para *Agrobacterium tumefaciens*, e subsequentemente os genes da GGPS introduzidos em *Arabidopsis*. Plantas de *Arabidopsis* transgênicas foram selecionadas em meio MS com gentamicina. Foi possível selecionar plantas transgênicas apenas do gene GGR, cuja confirmação nessas plantas foi feita através de uma qPCR com primers específicos. Os efeitos da superexpressão do gene GGR no crescimento e desenvolvimento de plântulas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), utilizada como planta alvo, foram analisados através de bioensaios com extrato aquoso de plantas de *Arabidopsis* transgênicos e selvagens. Os resultados mostraram que o extrato de *A. thaliana* selvagem inibiu significativamente o crescimento de plântulas de gergelim. Além disso, os testes também mostraram que as plantas contendo o transgene GGR apresentaram efeito fitotóxico aproximadamente duas vezes maior que aquelas não transformadas. As análises de PCR em tempo foram utilizadas para comparar o número de cópias do gene GGR entre o DNA plasmidial e plantas transgênicas. Adicionalmente, o fato das plantas transgênicas terem apresentado toxicidade mais elevada do que aquelas não transformadas, foi possível estabelecer uma associação direta entre a síntese de terpenos e os compostos alelopáticos.

Palavras chave: Superexpressão gênica, *Arabidopsis thaliana*, Terpenóides, Fitotoxicidade, Alelopatia.

ABSTRACT

Some genes are expressed at all times; others are subject to regulation and activated only when the cells require their products. The introduction of genes into plants or plant cells allows the modification of expression levels of genes involved in metabolic pathways that have been targeted to be studied. In addition, changes in gene expression levels allow to investigate gene functionality, as well as to obtain a better understanding of regulatory aspects of biosynthetic routes. Thus, this work aimed to overexpress and study the association between geranyl geranyl diphosphate synthase genes (GGPS), which are responsible for the synthesis of terpenoid precursors, and allelopathic compounds in *Arabidopsis thaliana* L. Terpenoids are one of the most diverse classes of secondary metabolites in plants and perform several roles such as growth regulators, as well as have been associated with plant/environment interactions. Moreover, terpenes have also been found as components of allelopathic compounds. In *Arabidopsis*, GGPS gene has multiple copies: among which are GGR, GGPS2 and GGPS6. For this study, the vectors containing each of these genes were acquired from an *Arabidopsis* gene bank. These genes were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* and subsequently introduced in *Arabidopsis* plants. Transgenic *Arabidopsis* plants were selected in MS medium with gentamicin. The only transgenic *Arabidopsis* plants selected contained the GGR gene, whose presence was confirmed by a qPCR with specific primers. The effects of GGR overexpression on the growth and development of sesame seedlings (*Sesamum indicum* L.) were analyzed through bioassays with aqueous leaf extracts of *Arabidopsis* transgenic plants in comparison with WT plants. The results showed that wild type (WT) *Arabidopsis* inhibited the growth of sesame seedlings. Moreover, plants with GGR transgene showed twice the inhibition observed with WT. Real-time PCR analysis compared the number of GGR copies in plasmidial DNA with transformed plants. Moreover, as *Arabidopsis* plants containing GGR transgene showed higher phytotoxicity than those non-transformed, a direct association between terpene syntheses and allelopathic compounds has been established.

Keywords: Gene overexpression, *Arabidopsis thaliana*, Terpenoids, Phytotoxicity, Allelopathy.

1. INTRODUÇÃO

Simplificadamente, expressão gênica é a decodificação de uma informação de um determinado gene em proteína. Em bactérias esse controle serve principalmente para permitir adaptações às mudanças nutricionais do ambiente, contudo, em organismos multicelulares a expressão gênica regula um programa genético fundamental para o desenvolvimento embrionário (KREBS et al., 2011).

A estrutura de um organismo depende da natureza da expressão dos seus genes e também da amplitude com a qual eles são expressos, bem como das condições ambientais nas quais ocorrem (BROWN, 2003). A síntese de alguns produtos gênicos é controlada por mecanismos que são coletivamente chamados de “regulação gênica”, e isto torna possível a adaptação do organismo a diferentes ambientes, assim como o seu próprio desenvolvimento (MALACINSKI, 2005).

Alguns genes são expressos sem interrupções nas células, conhecidos como genes constitutivos (*housekeeping genes*), tendo uma expressão uniforme e seus produtos estão presentes na maioria das células do organismo, como, por exemplo, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a actina (ACT) (BASTOLLA, 2007). Outros genes estão sujeitos à regulação e são ativados somente quando a célula requisita seus produtos. Além disso, existem genes que controlam a regulação de outros, sendo distintos dos demais, pois identificam os sinais bioquímicos que influenciam a expressão de determinadas características (BROWN, 2003). Além disso, pela introdução de genes não presentes em determinado organismo, é possível induzir sua expressão, ou, caso já existentes no genoma do organismo estudado, pode-se superexpressar genes de interesse, a fim de conhecer as consequências metabólicas dos altos níveis de expressão desses genes (SARTORETTO et al., 2008).

A introdução de genes em plantas ou células vegetais através de técnicas de engenharia genética via *Agrobacterium tumefaciens* (SMITH & TOWNSEND), ou biobalística permite a alteração dos níveis de expressão de genes envolvidos em vias biossintéticas de interesse. Esses genes de interesse podem ser oriundos da mesma espécie, de outra espécie vegetal, ou ainda de quaisquer outros organismos (ANDRADE, 2003). Esses processos permitem estudar a funcionalidade gênica, bem

como obter um maior entendimento das vias biossintéticas em seus aspectos regulatórios (MARASCHIN & VEERPOORTE, 1999). Assim, as técnicas de biologia molecular permitem introduzir alterações gênicas em plantas, possibilitando esses estudos de funcionalidade gênica (BROWN, 2003).

1.1. Superexpressão gênica

A superexpressão gênica é a indução do aumento da expressão de um gene que, em geral, é de grande importância em determinada rota metabólica. Para que isso ocorra é necessário que este gene seja colocado sob o controle de um promotor forte, visando o aumento/acúmulo do produto metabólico desejado (KREBS et al., 2012). Essa técnica consiste em obter o gene de interesse do organismo de origem e em seguida transferi-lo para outro, ou até mesmo para a espécie de origem. Esse procedimento visa estudar a função do gene em questão e as consequências metabólicas do aumento de sua expressão (MCNELLIS et al., 1994).

Hoje, com o surgimento de várias técnicas de biologia molecular, tais como RTq-PCR, Northern blots, Hibridização *in situ*, etc, é possível estudar as expressões dos genes, assim como o envolvimento destes no metabolismo vegetal (KREBS et al., 2012). A partir desses estudos, rotas metabólicas complexas têm sido investigadas, o que tem permitido esclarecer processos biossintéticos principalmente associados ao metabolismo secundário, o que tem sido muito útil e torna viável o desenvolvimento de programas de melhoramento genético de plantas (MARASCHIN & VEERPOORTE, 1999). Como exemplo, pode-se mencionar o caso de estudos sobre a rota metabólica do linalol em *Aniba dickei* Kostermans, que mostram o dl-linalol como agente larvicida do mosquito *Aedes aegypti* (TELES, 2009).

Hoje em dia, é muito comum a realização de trabalhos de superexpressão gênica, principalmente em *Arabidopsis thaliana* L. Como exemplo, a superexpressão do gene AtAREB1 em soja, envolvido diretamente em estresses dependentes do ácido abscísico, cujo objetivo foi melhorar as respostas da planta ao estresse hídrico (BARBOSA et al., 2012). Adicionalmente, RAO et al. (2011) superexpressou o gene PHYB de *A. thaliana* em algodão visando aumentar o rendimento da colheita do mesmo. Assim, podemos verificar que essa técnica pode ser muito utilizada na melhoria de plantas de forma mais rápida, o que pode ser uma estratégia econômica muito interessante para a agricultura.

1.2. Transformações em plantas

Durante séculos, o ser humano tem selecionado os mais diferentes organismos, incluindo as plantas, com o objetivo de conseguir indivíduos mais produtivos, ou melhores adaptados a condições ambientais adversas que os seus genitores. (SARTORETTO, 2008). O desenvolvimento de métodos de transformação, como a biobalística e a transformação mediada por agrobacterium tem possibilitado um grande avanço nas técnicas de melhoramento genético de plantas (HELLEN et al., 2000). Isso tem possibilitado a geração de plantas transgênicas que podem ser definidas como aquelas que apresentam genes (exógenos ou endógenos) introduzidos no genoma original por técnicas de engenharia genética (ANDRADE, 2003).

Entre os principais métodos de transformação estão a transformação mediada por *A. tumefaciens* e por biobalística (SARTORETTO, 2008). Em dicotiledôneas, o método mais comum é a transformação via agrobacterium, assim, plantas transgênicas estáveis são geralmente obtidas por essa técnica (HELLENS et al., 2000). Por outro lado, a técnica considerada mais eficiente em monocotiledôneas é a biobalística. A biobalística é eficiente em qualquer tipo de célula ou tecido (FERREIRA, 2006). O foco desta dissertação será prioritariamente dado à técnica mediada por agrobacterium, visto que tem sido empregada com sucesso em *A. thaliana* (ANDRADE, 2003).

1.3. Transformação via *A. tumefaciens*

A. tumefaciens é uma bactéria tipicamente de solo, um bacilo aeróbico e gram negativo. Estas bactérias possuem a capacidade de transferir o seu DNA para um hospedeiro induzindo a formação de um tumor conhecido como galha-de-coroa (GANDER & MARCELINO, 1997). Durante essa infecção, material genético da bactéria se integra ao genoma da planta infectada. Para a infecção se estabelecer é necessário que o hospedeiro tenha algum tipo de ferimento, por meio do qual, a bactéria irá iniciar o processo de transferência do DNA (BRASILEIRO & LACORTE, 2000). A capacidade de infectar as células vegetais está associada a um plasmídeo presente na bactéria, conhecido como Ti (do inglês: *tumor inducing*), cujo tamanho varia de 150 – 250 kb (BRASILEIRO & LACORTE, 2000). Durante o processo de estabelecimento da infecção, ocorre a liberação de moléculas sinalizadoras que ativam genes localizados no plasmídeo Ti, conhecida como região de virulência (Vir) (GOODNER et al., 2001).

Subsequentemente, proteínas codificadas pela região de virulência são expressas e promovem a transferência de outra região do plasmídeo, denominada de T-DNA (do inglês *Transfer DNA*), para o genoma nuclear da célula vegetal. O T-DNA possui genes oncogênicos que quando integrados ao genoma vegetal começam a se expressar formando o tumor, conhecido como galha-de-coroa (CLOUGH & BENT, 1998, GOODNER et al., 2001).

Para ser usado como instrumento na transformação de plantas, o plasmídeo Ti da bactéria *A. tumefaciens* precisa ser manipulado para conter os genes de interesse com o intuito de transferi-los para a planta a ser transformada, sem, contudo, causar a doença. Essa manipulação consiste em retirar do T-DNA as regiões oncogênicas, mantendo-se os genes de transferência e aqueles associados à replicação do plasmídeo (BRASILEIRO & LACORTE, 2000). Assim, a linhagem continua virulenta, porém, não mais patogênica. Os genes de interesse podem ser então introduzidos na região T-DNA do plasmídeo para então ser integrado ao genoma da planta (ANDRADE, 2003).

1.4. Organismos modelo

Para fins genéticos, organismos modelos são aqueles extensivamente usados em estudos genéticos que preenchem algumas características específicas, entre as quais se podem citar: tempo de geração curto e grande número de progênes (BUENO, 2009). Estas duas importantes características fazem destes organismos ideais para a análise genética e são também de grande utilidade para estudos de expressão gênica. Esta estratégia só é possível porque os princípios biológicos básicos e os genes que os codificam foram conservados durante a evolução. Estes, também são usados para descobertas de técnicas e identificação de genes com o uso de transformações genéticas. Dentre as espécies modelo mais utilizadas nesses estudos, estão: *Escherichia coli* (RILEY & LABEDAN, 1997), *Saccharomyces cerevisiae* (KUCHARCZYK & RYTKA, 2001), *Drosophila melanogaster* (ADAMS et al., 2000) e *A. thaliana* (LABRA et al., 2004). Esta última, tem sido de grande importância para os estudos na área vegetal (DELATORRE & SILVA, 2008).

1.4.1. Biologia de *Arabidopsis thaliana* L.

A Figura 1 mostra o aspecto geral de plantas *A. thaliana* que pertence à família Brassicaceae e por muito tempo foi considerada como erva daninha (MEYEROWITZ,

1998). Contudo, esta planta tem sido amplamente utilizada como modelo para estudos moleculares, e foi a primeira espécie vegetal que teve o seu genoma completamente sequenciado (*The Arabidopsis Genome Initiative* 2000). *Arabidopsis* preenche os requisitos para ser um organismo modelo por possuir características que incluem: curto ciclo de vida (4-6 semanas), uma grande produção de sementes, genoma pequeno e pequeno porte, o que possibilita o cultivo de várias plantas em espaços reduzidos ao mesmo tempo (DELATORRE & SILVA, 2008). Como mencionado, *A. thaliana* possui cinco pares de cromossomos contendo 25.498 genes preditos e um total de 115.409.949 bp. Seus genes são relativamente pequenos, com cerca de 4,6 kb em média (*The Arabidopsis Genome Initiative* 2000).

A. thaliana é uma espécie nativa da Europa e foi descrita pela primeira vez na Alemanha no século XVI. Apesar de originária da Europa, indivíduos dessa espécie podem ser encontrados em vastas áreas da América do Norte e da Ásia (DELATORRE & SILVA, 2008).

Após a germinação da semente de *A. thaliana* é possível observar os dois cotilédones verdes que se expandem e se abrem perpendicularmente ao hipocótilo. Logo após, aparecem primórdios foliares, formando a roseta característica da espécie (OLIVEIRA, 1999). Ocorre então o alongamento dos pecíolos e dos limbos, além do surgimento de uma serração na margem das folhas novas. É raro ocorrer mais de uma roseta associada ao mesmo sistema radicular (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002).

Adicionalmente, a raiz possui crescimento secundário e este se orienta em resposta aos estímulos da gravidade e da luz. As raízes laterais emergem da raiz primária e os pelos radiculares emergem das células epidérmicas. (OLIVEIRA, 1999).

Quanto à parte aérea, todas as folhas da roseta e o restante dos primórdios, incluindo as gemas axilares, se originam do meristema apical caulinar. O número de folhas da roseta varia com as condições de crescimento. Dias curtos favorecem o crescimento da parte vegetativa, enquanto dias mais longos favorecem o crescimento das partes reprodutivas (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002). Após algumas semanas de vida, em torno de 20 dias, cessa a formação de novas folhas na roseta e o eixo caulinar se prolonga e ramifica para servir de apoio a uma ou mais inflorescências. Essa etapa é

conhecida como “indução floral”, termo utilizado para designar uma mudança no padrão do crescimento da parte aérea. (DELATORRE & SILVA, 2008).

Semelhantemente às folhas, as flores também se formam em um padrão espiral com aproximadamente duas flores se abrindo por dia. Cada flor possui no verticilo externo quatro sépalas verdes, quatro pétalas brancas, seis estames e dois carpelos fundidos, que formam o gineceu interno, e em geral, possuem um tamanho médio de dois milímetros (CARTAGENA, 1998). O desenvolvimento dos pólenes ocorre dentro das anteras. Cada flor de *arabidopsis* pode produzir até 1000 grãos de pólen. Na maioria das flores ocorre autofertilização e todos os óvulos são fertilizados. Depois de fertilizado o óvulo, o tempo de maturação do embrião é de aproximadamente sete dias, quando as silíquas (vagens das sementes) se tornam amareladas e secam completamente (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002). As sementes possuem dimensões muito pequenas e ligeiramente ovais, possuindo um comprimento médio de 0,5 mm e largura média de 0,32 mm, completando assim o ciclo de vida de *A. thaliana* (CARTAGENA, 1998).

Arabidopsis também é uma grande produtora de metabólitos secundários. Em geral, os metabólitos secundários são específicos e restritos a uma espécie ou grupo de espécies vegetais, enquanto metabólitos primários são encontrados em todas as espécies do reino vegetal (D'AUDRIA & GERSHENZON, 2005).

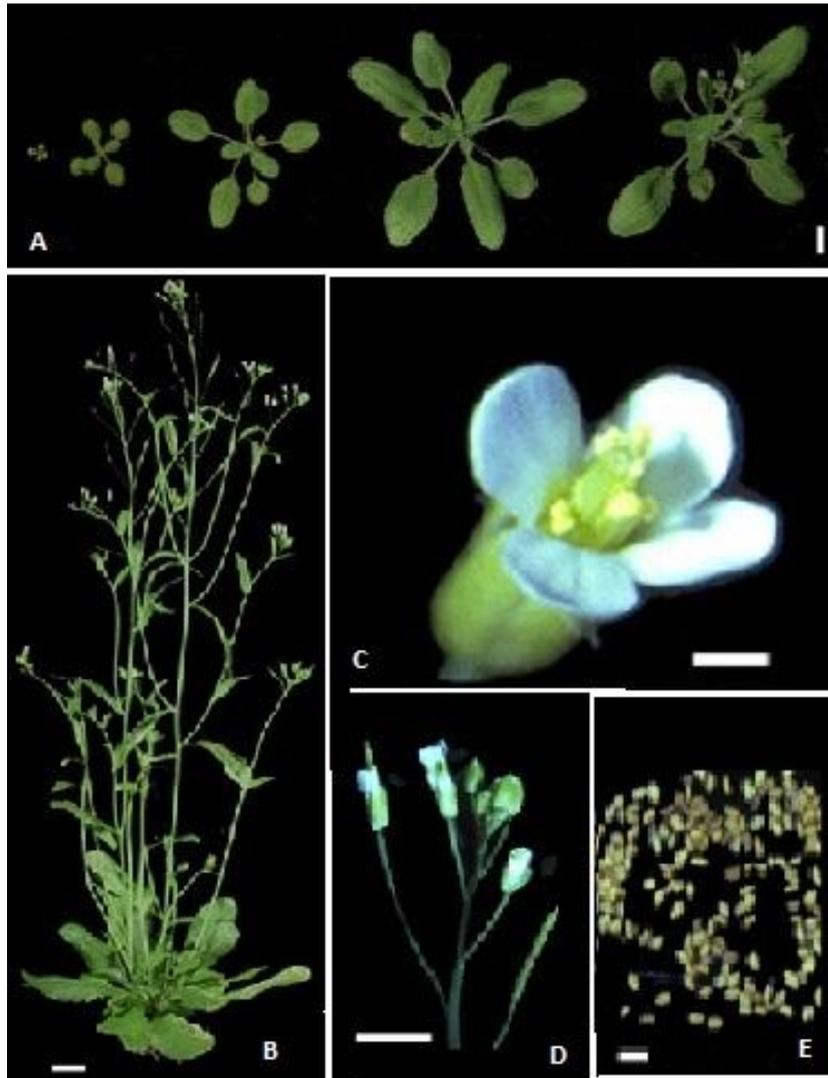


Figura 1. Vista geral da planta de *Arabidopsis thaliana* L. A) Estado vegetativo de *Arabidopsis thaliana* evidenciando desde o aparecimento dos cotilédones até o final da formação da roseta, onde cessam a formação de novas folhas. B) Planta adulta em estágio de floração. C) Flor em padrão de espiral. D) Estames. E) Sementes. Barras de escala = 1 mm. Modificado de *The Jean-Pierre Bourgin Institute*, 2012.

1.5. Metabólitos secundários

Metabolismo é o conjunto das reações químicas que ocorrem continuamente em cada célula (DEWICK, 2002). Graças a enzimas específicas, estas reações possuem uma direção que constituem as rotas metabólicas, e os compostos químicos resultantes são chamados de metabólitos. Essas reações promovem o aproveitamento de nutrientes para a satisfação das exigências metabólicas das células, como produção de energia e biossíntese das substâncias essenciais à sua sobrevivência (SIMÕES et al., 2003).

Ao conjunto de processos metabólicos que sintetizam, degradam e interconvertem compostos comumente encontrados em todos os organismos, dá-se o nome de metabolismo primário. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas, como é o caso dos aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e clorofila (PERES, 2011). Estes compostos desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, e são encontrados somente em organismos específicos ou em determinados grupos de organismos. (MARASCHIN & VEPOORT, 1999; DEWICK, 2002).

Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular e no passado, por muitos anos, foram considerados de pouca importância para as plantas. Contudo, nas últimas três décadas tornou-se evidente o importante papel que desempenham nas plantas (WINCK, 2010). O número de estruturas de compostos secundários descritas já excede 100000, porém, o número real certamente é muito maior, pois essas descrições correspondem apenas a 20 – 30% de plantas que foram investigadas nesse contexto (MARASCHIN & VEPOORT, 1999).

Apesar dos metabólitos secundários não serem produzidos em todas as fases da vida da planta, na vasta maioria dos casos as funções e benefícios destes compostos ainda não foram completamente desvendados. Entretanto, sabe-se que os metabólitos secundários possuem funções de extrema importância nas plantas, entre as quais: defesa contra herbivoria, fungos, bactérias e vírus; sinais para atração de polinizadores e para animais dispersores de sementes; proteção contra luz ultravioleta e contra outros tipos de estresses (PERES, 2004). Devido a essa variedade de substâncias bioativas, os metabólitos secundários possuem grande importância na indústria farmacêutica, na biotecnologia, na medicina e na agricultura (DEWICK, 2002; RUSSOWSKI, 2010).

Os mais importantes precursores para biossíntese de metabólitos secundários são derivados a partir dos intermediários da acetil-coenzima A (acetil-coA), ácido shiquímico, ácido mevalônico e 5-fosfato-1-desoxixilulose. Esses são utilizados respectivamente nas rotas do acetato, shiquimato, mevalonato e fosfato desoxixilose (RUSSOWSKI, 2010). Embora as reações bioquímicas sejam classificadas como sendo

do metabolismo primário ou do secundário, estas não ocorrem independentemente. Alterações nas reações bioquímicas dos metabólitos secundários podem afetar profundamente seus resultados, e existem relatos nos quais metabólitos secundários foram convertidos em metabólitos primários (DEWICK, 2002). Muitos metabólitos secundários são formados por sequências análogas do metabolismo primário, portanto, a linha divisória entre primários e secundários ainda não está bem definida (DEWICK, 2002).

Existem várias classes importantes de metabólitos secundários, entre elas: terpenóides, fenóis, alcaloides, taninos e compostos nitrogenados (PERES, 2011). Dentre as principais classes de compostos secundários, nos chamam a atenção os terpenóides por serem considerados de grande importância no crescimento e desenvolvimento das plantas.

1.6. Terpenóides

Os terpenóides constituem umas das classes mais diversificadas e desempenham funções na planta como reguladores do crescimento vegetal, mais especificamente as giberelinas, além de estarem associados em interações da planta com o ambiente (AHARONI et al., 2006). Portanto, plantas com alta produção de terpenóides têm sido objeto de interesse em programas de melhoramento de espécies cultivadas, visto que esses compostos estão associados à resistência de cultivares a doenças, controle de pragas (ZWENGER & BASU, 2007) e também no auxílio do controle de plantas daninhas através da produção de compostos fitotóxicos (SILVIA & MARTIN et al., 2006). Além disso, terpenos são componentes do aroma e sabor das plantas, o que é importante para plantas ornamentais e frutíferas além de aumentarem o valor comercial das mesmas (AHARONI et al., 2006). Também, esses compostos auxiliam a polinização através da produção de compostos essenciais para atração de polinizadores (ZWENGER & BASU, 2007).

Os compostos terpenóides são classificados de acordo com as unidades de cinco carbonos e são encontrados nas formas de monoterpenóides (10 unidades de carbono), sesquiterpenóides (15 unidades de carbono), diterpenóides (20 unidades de carbono), sesterpenóides (25 unidades de carbono), triterpenóides (30 unidades de carbono) e tetraterpenóides (40 unidades de carbono) (D'AURIA & GERSHENZON, 2005). Os

monoterpenos representam uma subclasse que inclui compostos muito comuns, como o citral, o linalol e a cânfora. Quanto aos sesquiterpenos, verifica-se que o aumento do número de carbonos ocorre concomitantemente com o aumento de ciclizações, levando a produção de uma grande quantidade de compostos, entre eles o Farnesil Difosfato (FPP) e o Geranyl Difosfato (GPP) (BOHLMANN et al. 1998). Os triterpenos caracterizam-se pela sua abundância. Nesse grupo estão incluídos metabólitos de grande importância biológica, como o colesterol, a vitamina D, hormônios sexuais nos mamíferos e inúmeros outros esteroides. Os terpenos de 40 unidades de carbono representam uma subclasse que inclui a maioria dos carotenoides (DI STATI, 1996).

Os terpenóides são abundantemente produzidos pelas plantas e já existem mais de 55.000 destes compostos isolados (MAIMONE & BARAN, 2007). A Figura 2 se refere à síntese de terpenóides e mostra que todos os terpenóides são sintetizados a partir da condensação de isopentenil difosfato (IDP) e seu isômero dimetalil difosfato (DMAPP) (CARRETERO-PAULET et al., 2002). A adição sequencial cabeça-cauda de unidades de IDP aos rendimentos do DMAPP geram os difosfatos como geranyl difosfato (GPP), farnesil difosfato (FPP) e geranyl geranyl difosfato (GGPP). GPP, FPP e GGPP são substratos para a síntese de terpenos (TPS). Estes três componentes servem como precursores de monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, respectivamente (AHARONI et al., 2006; AUBURG et al., 2002). A biossíntese dos terpenóides ocorre no citosol e nos plastídios das células. Os precursores IPP e DMAPP podem ser sintetizados pela via do mevalonato no citoplasma ou pela via do 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP) (Figura 2) (SAPIR-MIR et al., 2008). Além de sua função na síntese de terpenóides o GGPP é o precursor para a biossíntese de giberelinas, carotenóides, clorofilas, isoprenóides, quinonas e proteínas em plantas (OKADA et al., 2000).

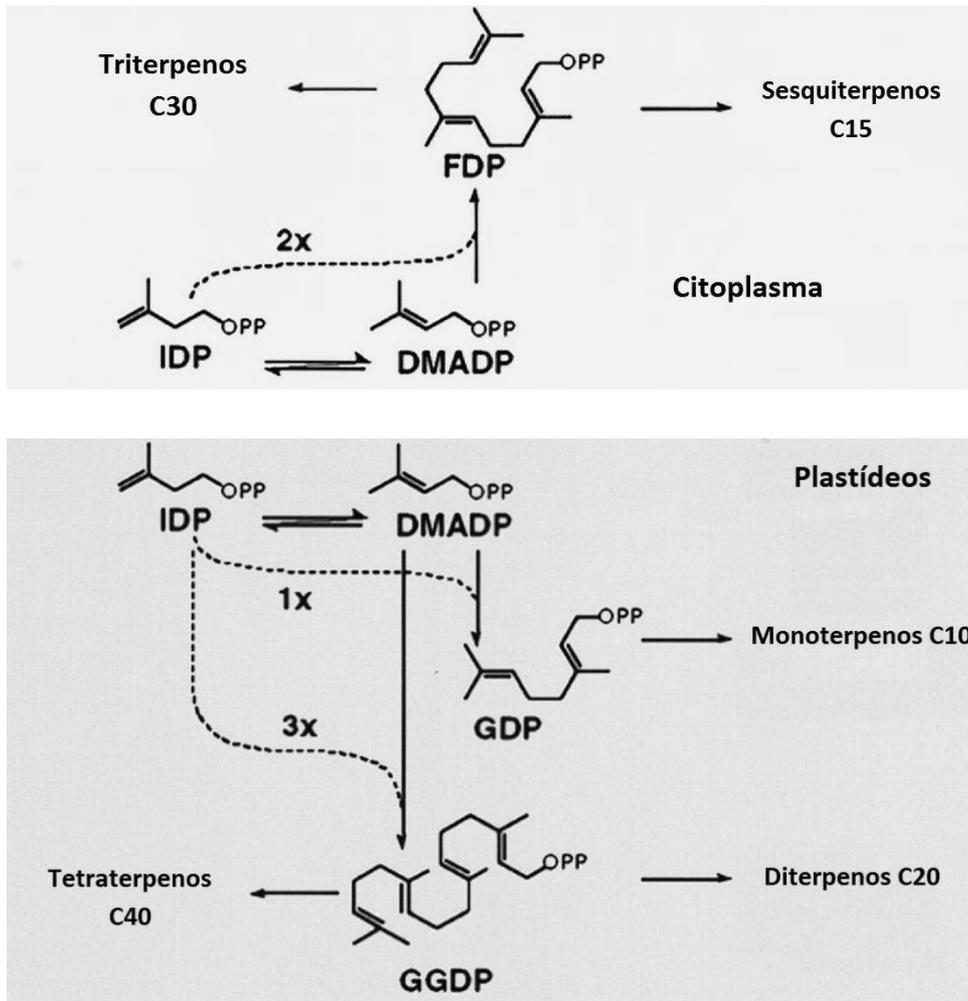


Figura 2. Esquema da síntese dos terpenóides a partir da condensação de isopentenil difosfato (IDP) e seu isômero dimetalil difosfato (DMAPP). Fonte: Bohlmann et al., 1998.

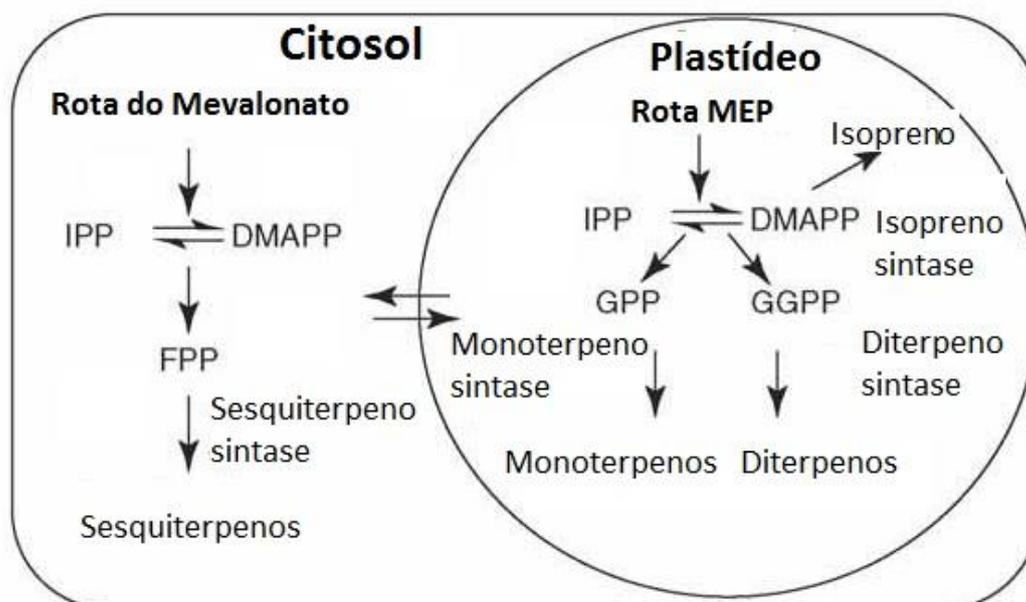


Figura 3. Esquema da síntese dos precursores IPP e DMAPP pela via do mevalonato no citoplasma ou pela via do 2-C-metil-D-eritrol 4-fosfato (MEP). Fonte: Bohlmann et al., 1998.

Em torno de 1000 novas estruturas de terpenóides são descritas a cada ano. Os terpenóides não são somente numerosos, mas são também extremamente variáveis em sua estrutura, exibindo centenas de diferentes esqueletos de carbono e uma grande diversidade de grupos funcionais como os óleos essenciais e as resinas de origem vegetal (BOHLMANN et al., 1998). Independente da sua diversidade, todos os terpenóides são unificados por um comum modo de biossíntese: a fusão de unidades de cinco carbonos com uma estrutura isoprenóide (D'AURIA & GERSHENZON, 2005).

1.7. Terpenóides em Arabidopsis

A descoberta de terpenóides especializados no metabolismo de *A. thaliana* foi algo incomum, devido à falta de perfume em seus tecidos e pela ausência de estruturas específicas como células e estruturas secretoras, que, em geral, ocorrem com frequência em plantas que acumulam terpenos em altas concentrações (CHEN et al., 2003; THOLL & LEE, 2011). Além disso, a elucidação do genoma de arabidopsis levou à caracterização das etapas essenciais da rota biossintética que produz os precursores para os metabolismos de terpenos, tanto os primários quanto os secundários (THOLL & LEE 2011). Em arabidopsis, IPP e DMAPP são sintetizados por duas rotas independentes, a

rota do ácido mevalônico (MVA) e a rota do metileritrol fosfato (MEP) (THOLL, et al., 2004). Em todas as plantas, todos os passos enzimáticos da rota MVA ocorrem no retículo endoplasmático, compartimento localizado no citosol da célula, onde são fornecidos os precursores da biossíntese de sesquiterpenos, fitoesteróis, brassinoesteróides e triterpenos (AHARONI, et al., 2003).

A rota MVA inicia-se com duas consecutivas reações de condensação de três moléculas de Acetil coA na forma de C6 composto 3-hidroxi-3-metilglutaril-coA (HMG-coA). No passo seguinte, que é irreversível nessa rota, o HMG-coA é convertido em R-mevalonato em dois passos de redução, cada um requerendo NADPH como redutor equivalente. Nos últimos três passos da rota MVA, o ácido mevalônico é convertido em isopentenil difosfato (IPP) por duas etapas de fosforilação, dependentes de ATP (GLEASON, 2012; THOLL & LEE, 2011).

A rota do metileritrol Fosfato (MEP) também provém de cinco carbonos e é responsável pela biossíntese de carotenoides, clorofila, giberelinas, monoterpênicos e diterpenos, que são exclusivamente produzidos nos plastídios (LEE, 2008; GLEASON, 2012). A primeira reação é a condensação da tiamina difosfato, derivada do piruvato, com gliceraldeído-3-fosfato para formar DXP. No segundo passo, DXP é convertido em 2-C-metil-eritrol 4-fosfato (MEP). Logo após, MEP é convertido em 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritrol (CDP-ME). O grupo hidroxila da posição C2 da enzima CDP-ME é mais fosforilado com gasto de uma molécula de ATP pela enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritrol quinase (CMK). O produto da enzima CMK, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritrol 2-fosfato (CDP-ME2P) é convertido em 2-C-metil-D-eritrol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) Nos últimos dois passos da rota, o MEcPP é convertido em 4-hidroxi-3-metilbut-3-enil difosfato (HMBPP) pela enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintase. Subsequentemente o produto HMBPP serve como substrato para a enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase, que finalmente é convertida em uma mistura de IPP e DMAPP. As duas rotas, MEP e MVA estão representadas na Figura 3 (THOLL & LEE, 2011; HAMANO et al., 2012; GLEASON, 2012; AHARONI et al., 2003, SAPIR-MIR et al., 2008).

Como mencionado, o desenvolvimento de técnicas de clonagem permitiu a identificação de diferentes genes envolvidos na síntese de terpenóides (TPS). Os

mecanismos de ação e evolução desses genes são de grande interesse para o entendimento de diversos processos em plantas nos quais os terpenos estão envolvidos (DUDAREVA et al., 2003). O gene que codifica a GGPP sintase, denominado *GGPP*, pertence à família das sintases que codificam cinco enzimas em arábidoopsis (OKADA et al., 2000). Assim, o gene *GGPP* é responsável por vários aspectos de crescimento e de desenvolvimento das plantas (IJIMA et al., 2004).

1.8. Geranyl geranyl difosfato

Uma larga variedade de produtos de plantas é derivada de isoprenóides. Eles são de extrema importância no crescimento e nas respostas a alterações ambientais das plantas. O terpeno geranyl geranyl difosfato (GGPP) é um dos principais isoprenóides que é convertido em compostos importantes para o crescimento das plantas, como giberelinas, carotenóides e clorofilas, e portanto, as GGPP sintases são enzimas responsáveis por vários aspectos de crescimento e desenvolvimento das plantas (THOLL & LEE, 2011).

Em *Arabidopsis* foram relatadas 12 sequências gênicas da GGPP sintase (BECK et al., 2013). O gene *GGPP* é regulado em diferentes compartimentos subcelulares onde ocorrem os diferentes tipos de GGPP sintase (SCOLNIK & BARTLEY, 1994, OKADA et al., 2000). De acordo com estudos, a regulação de GGPP sintase em arábidoopsis pode ocorrer em três locais diferentes: região do citosol, do retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (OKADA et al., 2000; BECK et al., 2013).

GGPP foi observado em cloroplastos de células epidérmicas do hipocótilo, em cloroplastos de células-guarda, em Retículo endoplasmático e mitocôndrias em *A. thaliana*, porém, cada um dos genes da GGPP sintase possui um local específico para ser expresso na planta. (OKADA et al., 2000).

1.9. Compostos alelopáticos

Alelopatia pode ser considerada como a liberação de substâncias químicas no ecossistema causada por determinado organismo que pode influenciar direta ou indiretamente o crescimento e desenvolvimento de outros organismos (WESTON, 1996; FERGUNSON & RATHINASABAPATHI, 2003). Os efeitos dessas substâncias sobre outros organismos podem ser prejudiciais ou benéficos.

Geralmente, as substâncias alelopáticas provêm de compostos do metabolismo secundário e são denominados de aleloquímicos, cuja composição pode conter terpenóides, fenólicos ou alcalóides. Como exemplo, em uma análise do potencial alelopático de *Stryphnodendron adstringens* se verificou que os compostos envolvidos nas respostas alelopáticas eram terpenóides (SILVA et al., 2006).

Um dos grandes potenciais de se estudar as substâncias aleloquímicas se baseia no fato de se usar esses compostos como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas. Sendo assim, compostos isolados da vegetação de uma determinada área podem ter significativa influência sobre os cultivos que ali serão instalados (FERREIRA, 2000). Estudos de compostos isolados da planta podem ser de grande importância, pois estes compostos podem ser usados como modelos moleculares para a síntese de novos agroquímicos ou ainda podem ser feitas incorporações de características para outras plantas através de melhoramento genético. Como exemplo, podem ser inseridos genes que atuam na fitotoxicidade da planta para torna-la uma herbicida natural.

Os pesticidas sintéticos geralmente são pouco biodegradáveis e possuem baixa especificidade, o que induziu a indústria farmacêutica a utilizar produtos naturais, tornando os organismos fitotóxicos muito importantes tanto na Agricultura quanto na indústria farmacêutica (SCHRADER et al., 2010).

De acordo com LEITHER & EINHELLIG (1988) os bioensaios são os testes mais apropriados para demonstrar atividades alelopáticas. Eles revelam a inibição de crescimento de uma espécie de planta sob outra através da germinação da semente e crescimento das plântulas.

1.10. *Sesamum indicum* L. (Gergelim)

Para este estudo, como espécie-alvo, foi escolhida a semente de gergelim (*Sesamum indicum* L.). Para que uma planta seja utilizada como espécie alvo é necessário que esta apresente germinação rápida e uniforme, além de um grau de sensibilidade aos aleloquímicos para que os resultados sejam visíveis ainda que em baixas concentrações de soluções (FERREIRA & AQUILA, 2000). O Gergelim preenche as características necessárias para ser uma espécie alvo (CARVALHO et al, 2001).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é superexpressar os genes envolvidos na síntese de Geranyl Geranyl Difosfato, importantes na síntese de terpenos, assim como estudar a associação destes genes com respostas alelopáticas de *Arabidopsis thaliana* L. em *Sesamum indicum* L. (Gergelim).

2.1. Objetivos Específicos

- Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* L. através de *A. tumefaciens*, contendo os genes de interesse GGR, GGPS2 e GGPS6 para a superexpressão destes genes em arabidopsis.
- Estudar o padrão de expressão de geranyl geranyl difosfato (GGPP) em arabidopsis.
- Avaliar o nível de transcrição desse gene em arabidopsis através de técnicas de RT-qPCR (Transcrição Reversa – PCR quantitativa).
- Realizar estudos fitotóxicos com as amostras obtidas e observar a possibilidade do envolvimento de terpenos em interações alelopáticas com o Gergelim (*Sesamum indicum*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento das plantas

As sementes de *A. thaliana* (Columbia) foram doadas pelo laboratório de apomixia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Em cada pote foram colocadas aproximadamente 15 sementes em substrato Germinar Leve®. Os potes foram colocados em câmara de crescimento tipo BOD com fotoperíodo de 16 h (luz) e 8 h (escuro) e temperatura de 20°C no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas– Departamento de Botânica UnB (Figura 4).

As sementes germinaram entre 6-7 dias após o plantio. Após primeira inflorescência (4 – 5 semanas após germinação) os talos foram cortados para encorajar o surgimento de novas inflorescências. As sementes foram colhidas e armazenadas em temperatura de 4°C para uso posterior.

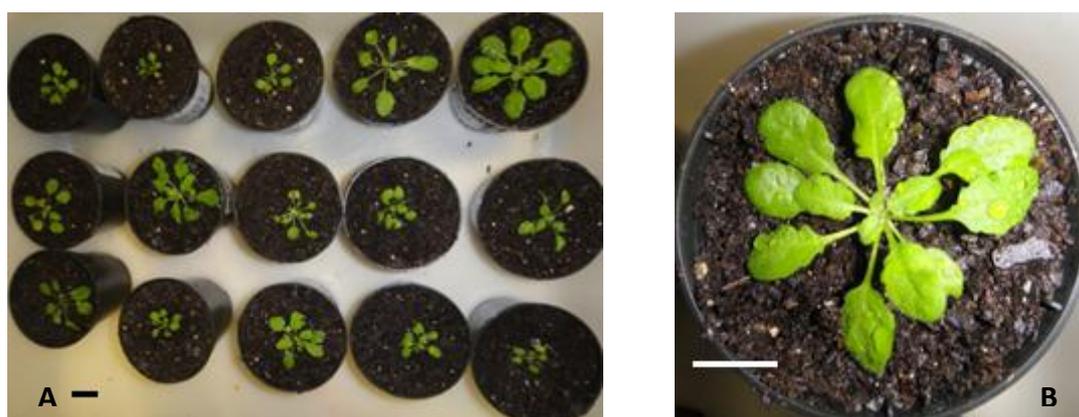


Figura 4. Vista geral de planta jovem de *Arabidopsis thaliana* L. A) Plantas jovens cultivadas em BOD com 22 dias de cultivo em sua fase vegetativa. B) Vista aproximada de uma planta de arabidopsis. A imagem mostra as folhas em forma de roseta, originadas do sistema apical caulinar. As barras representam 1 cm.

3.2. Aquisição de plasmídeos contendo os genes de interesse.

Os genes de *Geranyl geranyl difosfato sintase* (*GGPS*), de *Arabidopsis* estão depositadas em TAIR (The Arabidopsis Information Fonte - www.arabidopsis.org). Todos esse genes foram descritos e sequenciados por OKADA et al. (2000), e para esse estudo, os genes escolhidos foram: GGR, GGPS2 e GGPS6 que foram adquiridos da mesma fonte de dados (TAIR).

Os genes de interesse estavam inseridos no vetor pYL436, vetor derivado de pPZP (ver mapa em apêndice 4) introduzido em cepa de *E. coli* DH10B. Esse vetor foi construído pela técnica “Gateway” (Invitrogen) e contem o promotor 35S. Os antibióticos de resistência são: em bactéria – espectinomicina e em plantas – gentamicina.

3.3. Transformação em *A. tumefaciens*

Inicialmente, as bactérias contendo os genes de interesse foram crescidas em meio Lauria Bertani – LB (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e na presença do marcador de seleção específico, o antibiótico espectinomicina. O inóculo ficou em agitador com velocidade de 200 rpm, a 37 °C por 16 h. Amostras das cultura foram armazenadas em freezer a -80°C após a adição (9:1) de uma solução estoque 90% glicerol esterilizada.

Concomitantemente, foi feita a purificação dos plasmídeos contendo os genes de interesse (GGR, GGPS2 e GGPS6), com o Kit Lifesciences. O DNA plasmidial foi sequenciado na Coréia do Sul – Macrogen (CS) para a confirmação da correta inserção do gene.

Para a transformação em *A. tumefaciens* foi utilizada a técnica de eletroporação (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As técnicas de transformação e eletroporação foram realizadas no Laboratório de virologia do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.

Foram utilizadas duas cepas de agrobacterium: LBA4404 e GV3101. Foram utilizados cerca de 10ng de DNA de cada plasmídeo com o gene de interesse (GGPS6, GGPS2 e GGR) para 40 µL de células competentes. Para a eletroporação, foram utilizadas cubetas previamente resfriadas (Bio-Rad, 1mm). Logo após, o DNA foi adicionado na célula de agrobacterium e foi transferida imediatamente para a cubeta previamente resfriada. A condição de eletroporação foi 2,5KV, 2,5 µF e 200Ω (Bio-rad).

Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado a cubeta o meio SOC (SAMBROOK & RUSSEL, 1991). As culturas transformadas foram incubadas sob agitação de 180 rpm por 1 h. As culturas foram plaqueadas em meio LB3 e ágar (1 g.L⁻¹

¹) com os antibióticos espectinomicina 50 µg.mL⁻¹ e rifampicina 50 µg.mL⁻¹. Após 48 h, foi observado o surgimento de colônias bacterianas nas placas incubadas, indicando a presença de bactérias resistentes ao agente microbiano, portanto, transformadas.

Foram feitas soluções estoque em glicerol 80% de cada cultura de agrobacterium transformadas com os genes de interesse (GGPS6, GGPS2 e GGR) em meio LB3 líquido com os antibióticos: espectinomicina e rifampicina. As culturas foram armazenadas a -80°C para posterior transformação em *A. thaliana*.

3.4. Transformação de *A. thaliana* e seleção das plantas transformadas

Para transformação foram crescidas de 10 a 15 plantas de arabis em potes de 10x10 cm, com fotoperíodo de 16 h de luminosidade e 8 h de escuro, e temperatura de 20°C. Essas plantas foram cultivadas na sala de crescimento de *A. thaliana* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos. O espaço foi cedido pelo laboratório de Apomixia.

Após a planta atingir idade reprodutiva (aproximadamente 21 dias), a primeira inflorescência foi removida assim que emergiu. Isso estimulou o crescimento de novas inflorescências, que cresceram com maior número de flores.

Para a transformação, uma pré-cultura foi feita, inoculando-se em tubo falcon 5 mL de cultura líquida (meio LB3 com os antibióticos espectinomicina e rifampicina) de cada amostra de agrobacterium transformada. Esse pré-inóculo foi incubado sob agitação de 180 rpm a 28 °C por dois dias. Após isto, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 250 mL de meio LB3 juntamente com os mesmos antibióticos. Este inóculo foi mantido sob agitação a 180 rpm, 28 °C, por 24 h. As culturas de agrobacterium foram então centrifugadas em velocidade de 600 rpm por 10 min em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 250 mL de solução de sacarose 5%. A essa solução, foi adicionado o surfactante Silwet – L77 0,05% (Momentive).

As flores de *A. thaliana* foram mergulhadas nessa solução de agrobacterium de 2 a 3 segundos sob agitação (Figura 5). Após o mergulho, as plantas foram cobertas com filme plástico (24 h) para manter a umidade e absorver melhor a solução. No dia seguinte a planta voltou a receber água normalmente.

Toda a técnica de transformação foi repetida uma semana depois para que as flores que ainda estavam muito jovens na primeira transformação pudessem receber também a solução de agrobacterium, aumentando assim a eficiência da técnica.



Figura 5. Técnica de mergulho floral. Flores de plantas de arabidopsis foram colocadas em solução de sacarose 5% com o surfactante Silwet – L77 0,05%, misturadas ao meio de agrobacterium contendo gene de interesse para transformação. Laboratório de Apomixia – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). A barra representa 1 cm.

Duas semanas após a transformação as sementes foram colhidas e separadas de acordo com o gene de inserção e armazenadas a temperatura de 4 °C até a utilização.

Após terem sido colhidas, as sementes foram desinfestadas em uma solução de lavagem composta por etanol 70% e Triton X-100 0,05%. Logo após essa lavagem as sementes foram enxaguadas em etanol 95% e novamente colocadas na solução de lavagem. Foram colocadas aproximadamente 25 sementes em cada placa com o meio de cultura MS e antibiótico de resistência gentamicina 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As placas foram colocadas em câmara de germinação BOD com fotoperíodo de 16 h de luminosidade e temperatura de 20 °C. Após três semanas, as plantas selecionadas foram transferidas para vasos com substrato e esses foram colocados de volta na BOD, a fim de obtenção de sementes para cultivo da primeira geração. Essa seleção foi repetida quatro vezes.

As sementes das primeiras plantas foram coletadas e selecionadas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) contendo antibiótico de resistência

gentamicina $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 22 dias, as plantas que cresceram (primeira geração) foram analisadas através de técnicas de PCR para confirmação da transgenia.

3.5 Confirmação da transgenia

Para PCR de confirmação da transgenia foram desenhados primers específicos para o T-DNA do plasmídeo pYL436 e primers específicos para os genes de interesse. As sequencias utilizadas para os primers foram: GGR reverse, GGPS2 reverse, GGPS6 reverse e pYL436 forward (anexo 5). A temperatura de anelamento utilizada para todos os primers foi de 60°C . Foram feitos controles positivos para os três genes de interesse com o uso do DNA plasmidial adquirido através de Mini-prep. Como controle negativo, foi utilizado cDNA de *A. thaliana* selvagem.

3.6 PCR em tempo real – quantificação absoluta em plantas transgênicas

Primeiramente foi feita uma reação para obtenção da curva padrão dos genes: GGR, GGPS2 e GGPS6. Para isso foi necessário utilizar o plasmídeo clonado com cada um dos genes de interesse e primers específicos para cada um. Para o gene GGR, os primers utilizados foram: GGR senso e GGR antisenso; para o gene GGPS2, os primers utilizados foram: GGPS2 senso e GGPS2 antisenso e para o gene GGPS6 os primers foram: GGPS6 senso e GGPS6 antisenso (anexo 5). A temperatura para anelamento utilizada para todos os primers foi de 60°C . Como controle, foram utilizados cDNA de planta selvagem com oligoDT.

As diluições seriadas foram realizadas para uma concentração inicial de $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, atingindo assim, uma diluição inicial de 10^{10} cópias.

Após a confirmação da primeira geração das plantas transgênicas com PCR, o RNA total das folhas de cada linhagem transformada foi extraído com o uso do kit STRN50© (Sigma-Aldrich). O RNA foi quantificado e incubado com enzima DNase para sua purificação. Após, foi feito o cDNA com a utilização do kit HSRT-100© (Sigma-Aldrich). Esses passos foram repetidos para todas as linhagens obtidas do gene de interesse GGR (4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM). Foi realizada a PCR em tempo real para cada uma das linhagens, com as mesmas diluições utilizadas para o DNA plasmidial. O reagente utilizado para a qPCR é o SYBR® green, que possui uma

ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para quantificar a PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação.

3.7 Testes de atividade Biológica com gergelim (*Sesamum indicum*)

Foram preparados bioensaios com as folhas das plantas selvagens e com as folhas da primeira geração das plantas transformadas de *A. thaliana* para identificar possíveis efeitos fitotóxicos nas plantas alvo (gergelim).

Após 22 dias do plantio, todas as folhas de *A. thaliana* selvagem e transgênicas, cultivadas com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 20 °C foram coletadas e secadas em estufa com temperatura de 40 °C por um período de 24 h.

Após a secagem, as amostras foram trituradas e usadas para se preparar extratos foliares diluídos a 3% (p/v). Colocou-se o extrato foliar a 4 °C durante 24 h. Subsequentemente, a solução foi filtrada a vácuo e utilizada no preparo de diluições 3,0%, 1,5% e 0,75%.

Para cada diluição foram colocadas 10 sementes de gergelim em placas de Petri (5,5cm \varnothing) com papel filtro para germinar, fazendo-se três repetições, com 1 mL de extrato aquoso em cada placa, para cada concentração de extrato (Figura 6). O controle foi feito com o mesmo número de sementes crescidas em água destilada. As plantas foram colocadas para germinar em câmara de germinação por um período de seis dias. A germinação foi verificada diariamente com intervalos de 24 h registrando-se o número de sementes germinadas. Após os seis dias, foram medidas as partes aéreas e radiculares das plântulas com auxílio de paquímetro digital.

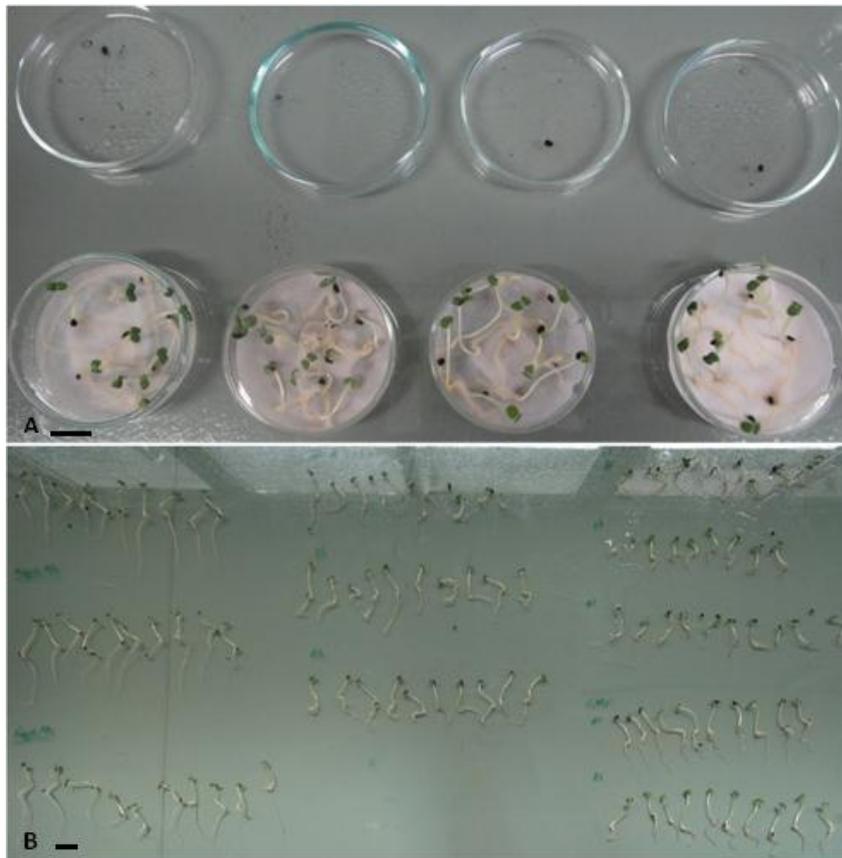


Figura 6. Plântulas de Gergelim crescidas sobre extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana*: A) Plântulas de gergelim germinadas em placas de Petri com solução aquosa, após seis dias da montagem do bioensaio. B) Plântulas dos diferentes tratamentos (3,0; 1,5 e 0,75%) colocadas em placa de vidro para medição com paquímetro digital. Barras de escala = 1cm.

3.8 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Bioestat 5.0. Foram realizados testes paramétricos e não-paramétricos conforme as amostras. Para os testes paramétricos, foi utilizado teste de Tukey e para os não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-wallis. Todos os testes com referência $p > 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Sequenciamento do DNA plasmidial

Os cDNAs dos genes de interesse GGR, GGPS2 e GGPS6 foram adquiridos do TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*), cujo vetor de inserção, pYL436, estava inserido em cepa de *E. coli* DH10B. Estoques de amostras de *E. coli* contendo o vetor de inserção em glicerol 80% (90:10) estão armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Botânica da UnB com os seguintes registros: DKLAT1G49530 (Gene GGPS6); DKLAT2G23800 (Gene GGPS2) e DKLAT4G38460 (Gene GGR). O sequenciamento do gene GGR obteve 100% de identidade com a sequência depositada no banco de genes (NCBI) através de Blastn. Já o gene GGPS2 o índice de identidade foi de 98% e o gene GGPS6 foi de 99% de semelhança com as respectivas sequências depositadas no banco de genes do NCBI.

4.2 Seleção de plantas transformadas

Após a transformação das plantas de arábido, a seleção foi feita colocando as sementes dessas plantas para germinar e crescer por duas semanas em placas de Petri com meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e antibiótico gentamicina. Foram feitas quatro seleções com 40 placas cada, sendo 10 placas para cada gene (GGR, GGPS2 e GGPS6) e 10 placas de controle (não-transformadas). Comparadas com as plantas controle, as plântulas transformadas se mostraram capazes de germinar e se desenvolver na presença de gentamicina e morfologicamente tinham raízes longas e folhas verdes, enquanto que as não-resistentes ao antibiótico se mostraram esbranquiçadas e morreram (Figura 7).

Ao todo, apenas sete plantas do gene GGR foram selecionadas, porém, apenas cinco foram confirmadas. Do gene GGPS2, foram selecionadas três plantas, porém, nenhuma foi confirmada e do gene GGPS6 foram selecionadas seis plantas, onde, nenhuma foi confirmada como transgênica, assim como as plantas selecionadas para o gene GGPS2.

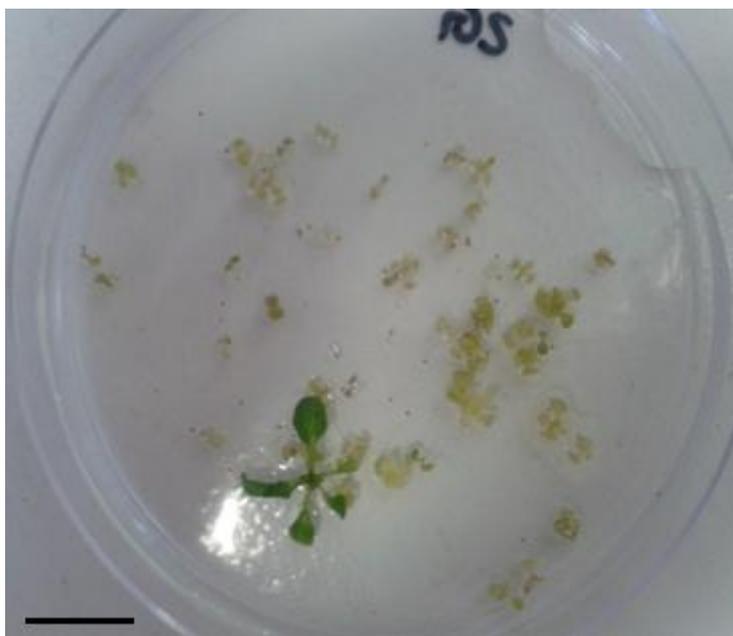


Figura 7. Placa contendo meio MS e o antibiótico gentamicina para seleção de plantas transgênicas contendo o gene GGR. A plântula com folhas verdes indica resistência à gentamicina. Em contraste, existem plântulas que não se desenvolveram que tinham aspecto esbranquiçado, portanto, não resistentes à gentamicina. Barra de escala = 1cm.

4.3 Confirmação da integração dos transgenes

Para a confirmação da presença do gene GGR foi realizada uma PCR com DNA extraído das plantas selecionadas com antibiótico, com a utilização dos primers específicos PYL436 Fw e GGR Rev. De acordo com a PCR, apenas cinco das sete plantas selecionadas continham o gene de interesse GGR (Figura 8). As amostras que apresentaram a presença do transgene foram: 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM. O resultado da PCR dessas plantas mostrou cinco bandas de 250 bp, o que corresponde ao tamanho esperado do fragmento amplificado pelos primers supra citados (Figura 8).

Assim, a presença destas bandas confirma que as amostras das linhagens 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM continham o gene transferido no seu DNA.

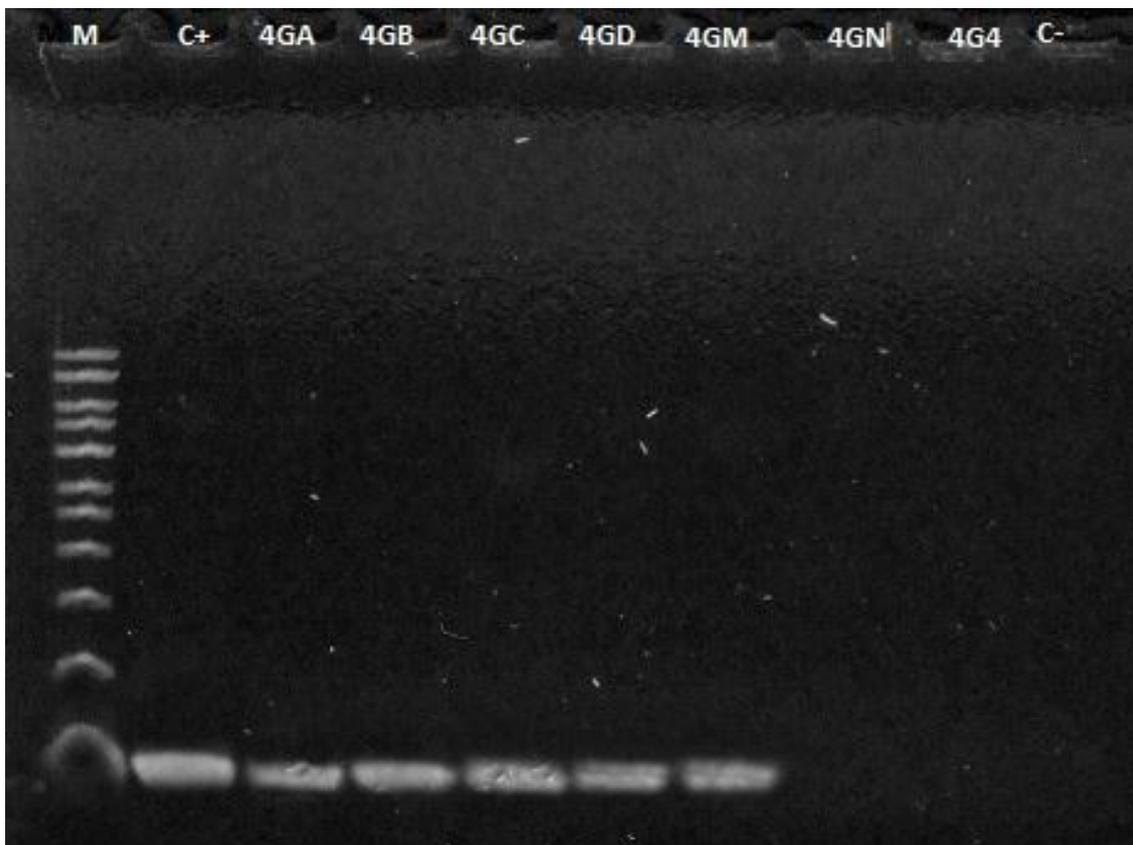


Figura 8. Avaliação de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose: PCR com as amostras das plantas testadas para confirmação da presença do fragmento GGR nas amostras das plantas selecionadas. As bandas que apareceram foram o controle positivo e as amostras: 4GA, 4GB, 4GC, 4GD, 4GM (Todas apresentando tamanho de 250pb). As amostras 4GN e 4G4 não foram confirmadas como transgênicas. C+ = controle positivo (DNA plasmidial); C- = controle negativos (cDNA planta selvagem). M = Ladder 1Kb 250pb. Os primers utilizados foram o PYL436 Fw e o GGR rev.

4.4.PCR em tempo real absoluto

Usando-se o *cicle threshold* (número do ciclo onde o acúmulo de fluorescência na reação inicia sua fase exponencial de amplificação), de agora em diante “ct”, foram feitas curvas padrões via RT-PCR correspondentes aos genes GGPS2 e GGPS6 para determinar o número de cópias (Figuras 9 e 10) Apesar de várias tentativas, não foi possível obter uma curva padrão confiável para o gene GGR. Para este gene, os cts começaram a aparecer em ciclos muito tardios na PCR, o que não proporciona a confiabilidade necessária na curva obtida.

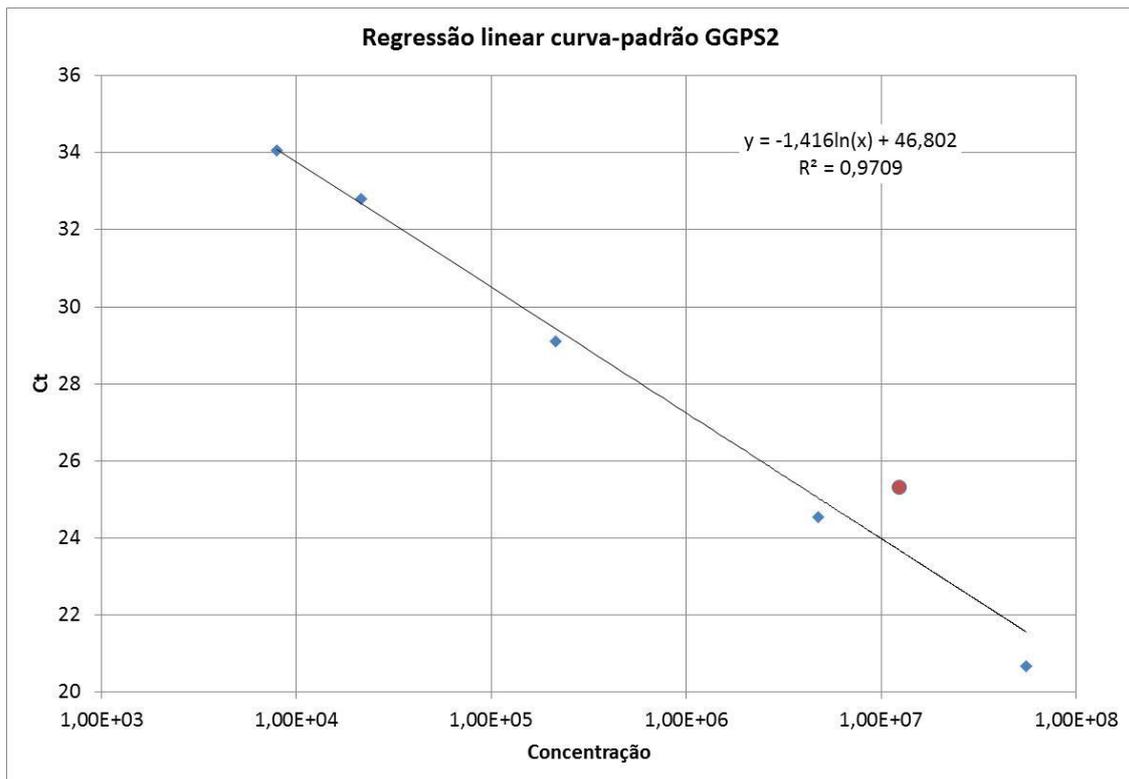


Figura 9. Curva-padrão para o gene GGPS2. Azul: Número de cópias e valores de *cycle threshold* (ct) das diluições 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 Vermelho: Número de cópias do cDNA (utilizado como controle para obtenção de curva-padrão com uso de DNA Plasmidial)

A eficiência de amplificação alcançada na reação de PCR em tempo real para o plasmídeo contendo o gene GGPS2 foi de 0,9, correspondendo a 90%. O Slope (inclinação) apresentou valor de -3,5 e a correlação de confiabilidade dos dados foi de 97% (Figura 9).

A eficiência de amplificação alcançada na reação de PCR em tempo real para o plasmídeo com o gene de interesse GGPS6 foi de 1,03 correspondendo a 103%. O Slope (inclinação) apresentou valor de -3,24 e a correlação de confiabilidade dos dados foi de 99% (Figura 10).

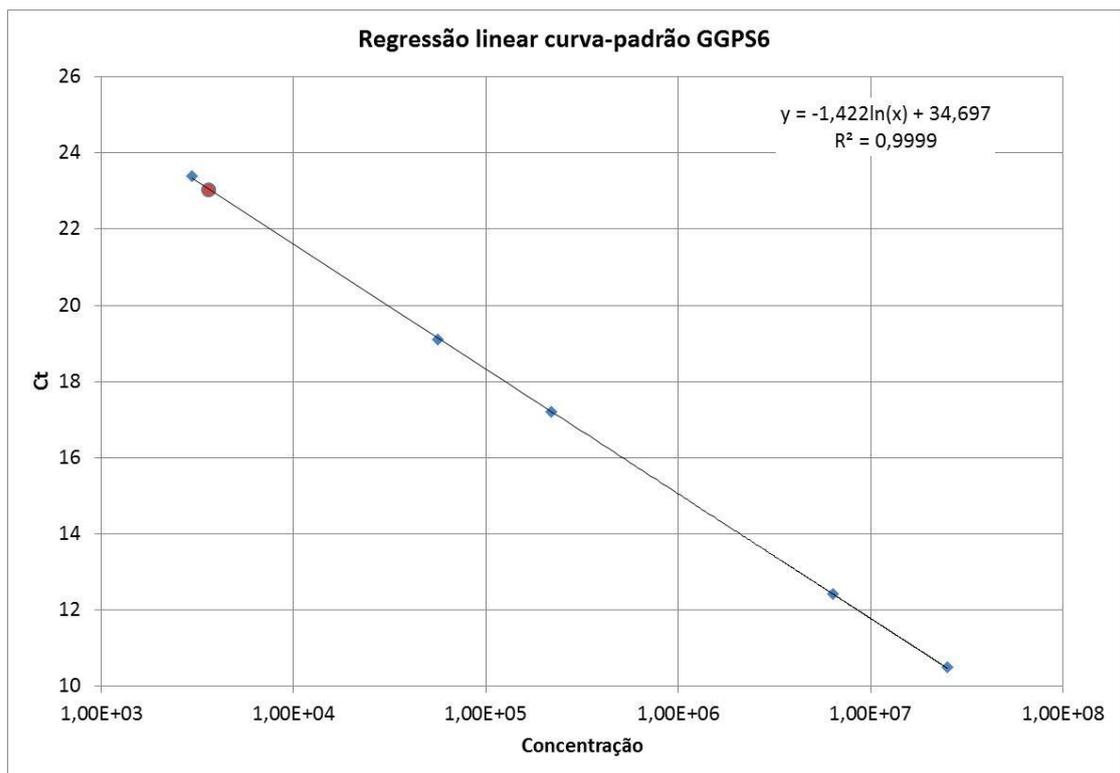


Figura 70. Curva padrão para o gene GGPS6. Azul: Número de cópias das diluições 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 . Vermelho: Número de cópias do cDNA (Extraído da planta selvagem para ser utilizado como controle para obtenção de curva-padrão com uso de DNA plasmidial).

4.4.1 Comparação de cts (*Cycle Threshold*) de DNA plasmidial com plantas transgênicas

Apesar dos genes GGPS2 e GGPS6 terem tido ótimas curvas-padrões, nenhuma planta transgênica foi selecionada desses genes. Portanto, nenhuma curva de RTq-PCR dos genes GGPS2 e GGPS6 foi usada para comparação de ct. Do gene GGR, foram confirmadas cinco amostras de plantas transgênicas, a saber, 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM. Como a curva-padrão desse gene (GGR) não pode ser obtida de forma confiável, as comparações entre os ct (início da fase exponencial de amplificação) do DNA plasmidial e do DNA de cada planta transgênica foram feitas para analisar se ocorreu ou não aumento do número de cópias desse gene nas plantas transformadas.

Na corrida com a amostra das plantas transgênicas 4GA, a média do ct variou entre 31,52 e 32,45 e o ct do DNA plasmidial ficou entre 33,14 e 33,66 (Figura 11). A média foi definida através dos valores de triplicatas feitos com todas as amostras. É

possível observar que estes valores são semelhantes, o que indica que o nível de cópias da linhagem 4GA e o DNA plasmidial não diferiram entre si (Figura 11).

Com respeito à linhagem 4GB, a média do ct variou entre 32,99 e 34,33 e o do DNA plasmidial entre 33,14 e 33,66 (Figura 11). Semelhantemente à linhagem 4GA, não se verificou diferenças nos níveis de transcritos entre 4GB e plasmidial. O mesmo padrão foi observado para 4GC e 4GM. Na linhagem 4GC o ct ficou entre 31,47 e 34,13 e o plasmidial entre 33,14 e 33,66 (Figura 11). Em 4GM a média dos valores de ct dessa linhagem variou entre 37,69 e 40,71 do DNA plasmidial entre 34,99 e 38,25. O número de cópias absolutas obtidos das amostras 4GA, 4GB e 4GC, comparados com o número de cópias do DNA plasmidial estão representados na Figura 12.

Entretanto, foi observada para a linhagem 4GD, cuja média do ct variou entre 25,06 e 35,46. Já o ct do DNA plasmidial variou entre 34,99 e 38,25 (Figura 13), sendo significativamente maior que aquele das amostras de 4GD. É importante dizer que a média de ct das amostras de 4GD foram mais baixas que o plasmidial, o que é esperado quando ocorre o aumento de transcritos de um gene em determinado organismo. Conseqüente, o número de cópias da amostra 4GD mostrou um aumento em relação ao número de cópias da amostra de DNA plasmidial. Este resultado, assim como os valores mais baixos de ct, sugerem um maior número de transcritos linhagem transgênica 4GD (Figura 14).

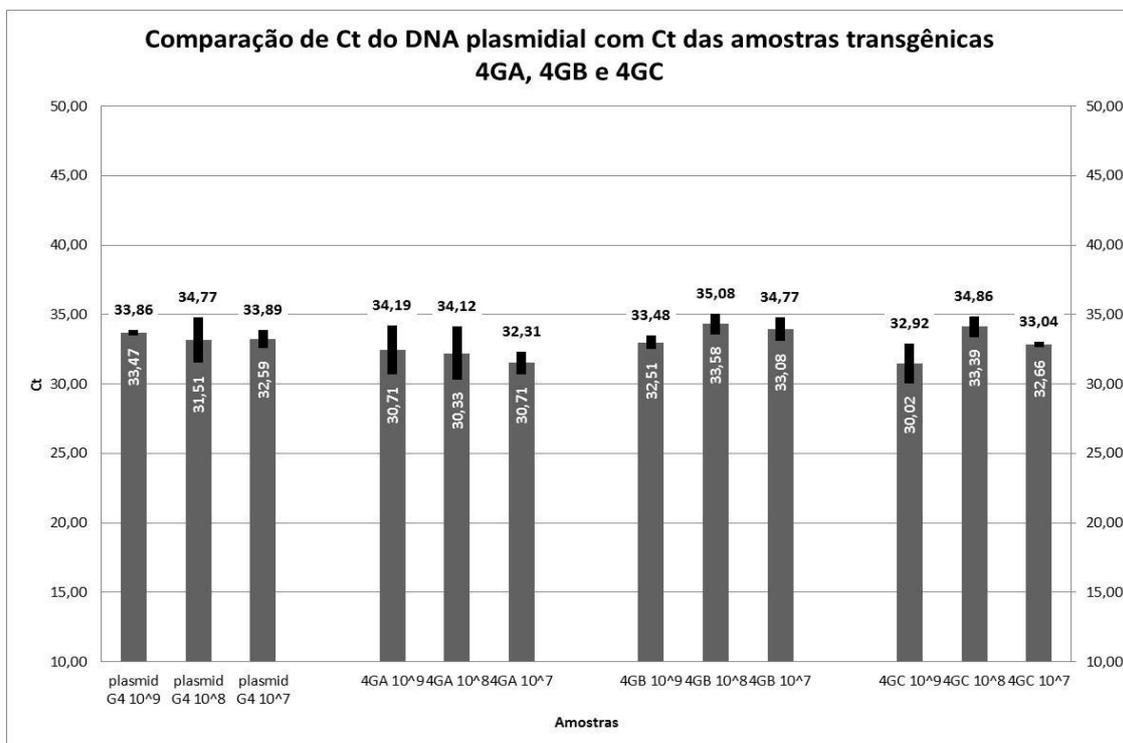


Figura 11. Comparação de ct de DNA plasmidial com ct das amostras das linhagens transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. O gráfico representa os valores de ct do controle (DNA plasmidial) e o ct das amostras transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. Todas as amostras participaram da mesma corrida de PCR em tempo real.

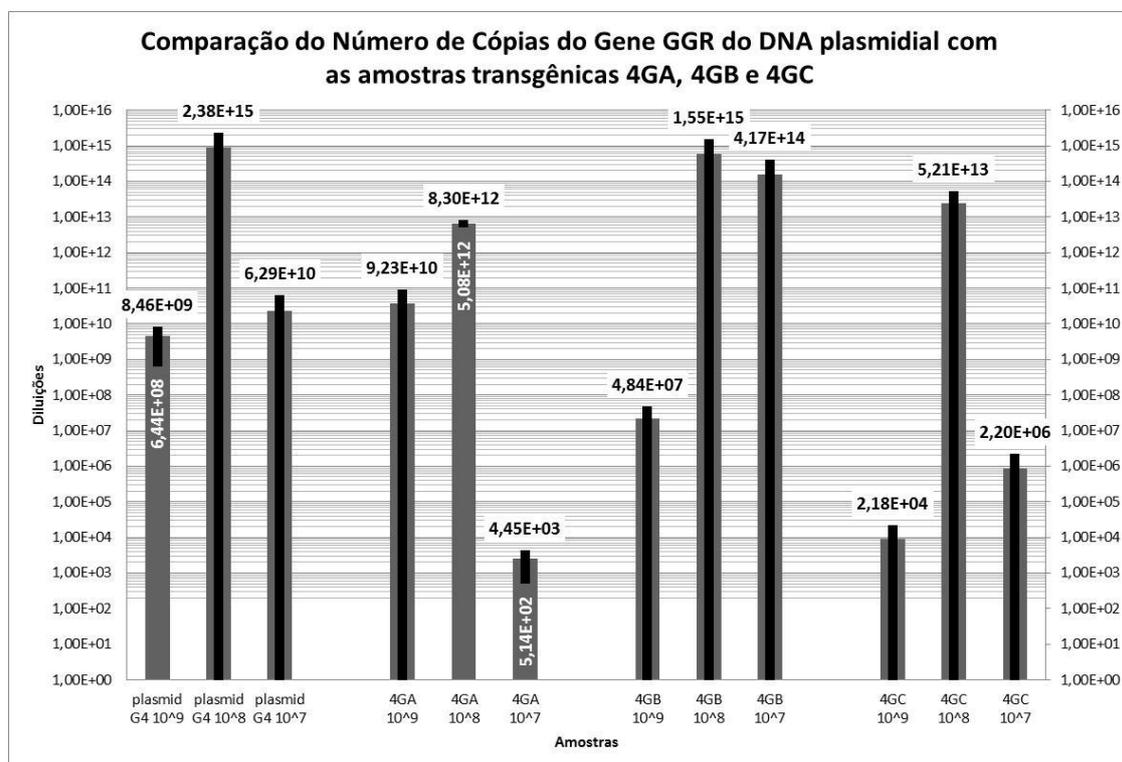


Figura 128. Compara o do Número de cópias do Gene GGR do DNA plasmidial com as amostras das linhagens transgênicas 4GA, 4GB e 4GC. O gráfico representa o número de cópias do controle (DNA plasmidial) e o número de cópias do gene GGR das amostras transgênicas 4GA, 4GB e 4GC de arabis (22 dias) obtidas na mesma corrida de PCR em tempo real.

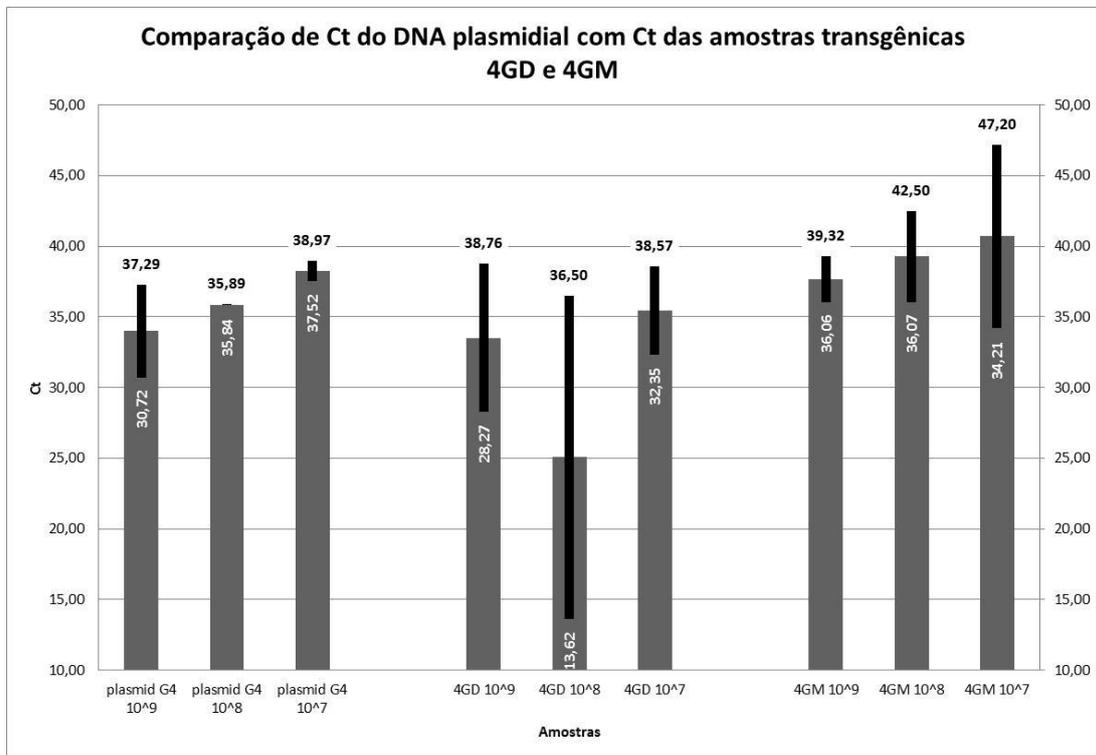


Figura 13. Comparação de ct de DNA plasmidial com ct das amostras das linhagens transgênicas 4GD e 4GM. O gráfico representa os valores de ct obtidos através de PCR em tempo real da amostra controle (DNA plasmidial) e das amostras transgênicas 4GD e 4GM. Todos os valores foram obtidos na mesma corrida.

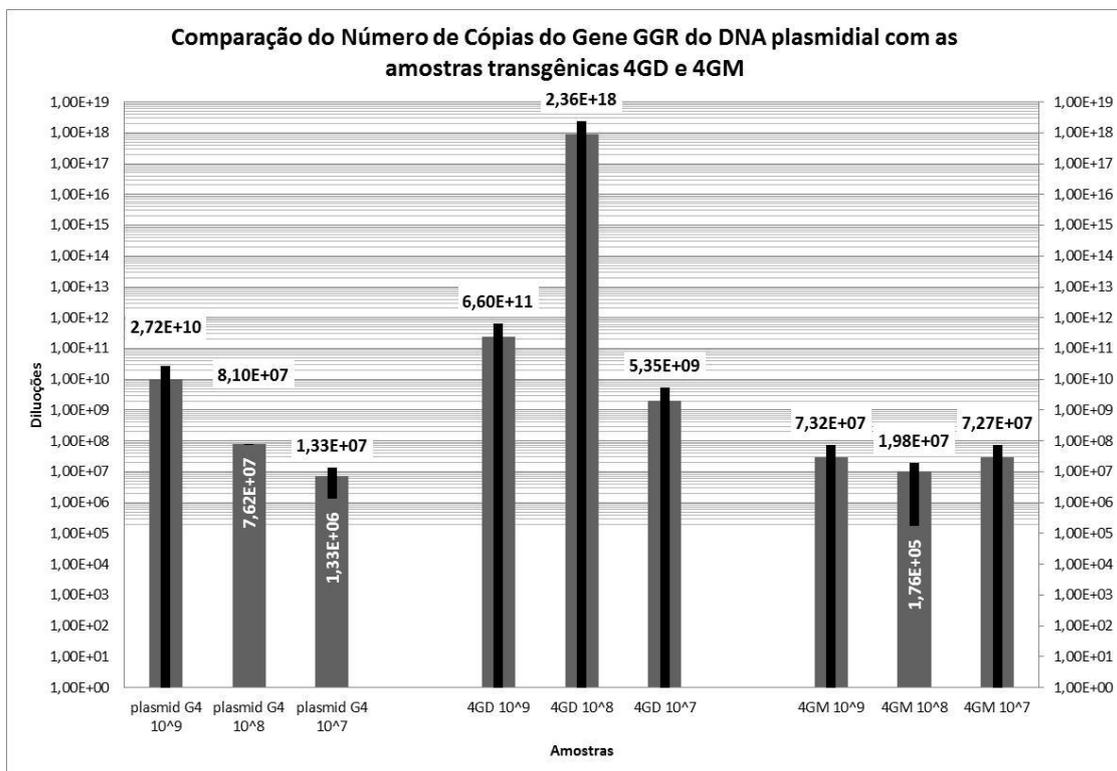


Figura 14. Comparação do número de cópias do gene GGR do DNA plasmidial com as amostras das linhagens transgênicas 4GD e 4GM. O gráfico representa o número de cópias do gene GGR do controle (DNA plasmidial) e das amostras 4GD e 4GM de arabidopsis (22 dias). Todos os valores são referentes a mesma corrida de PCR em tempo real.

4.5. Inibição de crescimento do gergelim na presença de extrato foliar aquoso de *A. thaliana*.

Para avaliação do potencial alelopático de plantas transgênicas de *A. thaliana* contendo o gene GGR foram feitos bioensaios utilizando três diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas de plantas de arabidopsis não-transformadas e transformadas: 4GA, 4GB, 4GC, 4GDe 4GM. As plântulas de gergelim foram germinadas e crescidas nas seguintes concentrações de extrato aquoso de folhas de arabidopsis: 0% (controle), 0,75%, 1,5% e 3% (Figura 15). Comparado com o tratamento controle, o extrato foliar de arabidopsis não-transformado diluído a 3% induziu uma inibição do crescimento médio das plântulas de gergelim de 78% e 39% no crescimento radicular e parte aérea, respectivamente (Figuras 16).

Com respeito ao extrato diluído a 1,5% de arabidopsis selvagem, o crescimento da parte radicular da plântula de gergelim apresentou uma inibição de 70% e a parte aérea foi inibida em torno de 26% quando comparados ao crescimento observado daquelas crescidas em água (Figura 16). Em comparação com concentrações maiores, o efeito inibitório do extrato diluído a 0,75% foi menor, o que pode ser visto principalmente pelo crescimento mais expressivo da parte radicular (Figura 15). Nessa concentração de extrato as raízes tiveram uma inibição no crescimento de 57% enquanto na parte aérea foi de 38% em relação ao controle (Figura 17).

Plântulas crescidas em todas as diluições do extrato foliar de arabidopsis não-transformado exibiram uma inversão da resposta gravitrópica do crescimento da raiz como mostrado na Figura 16.



Figura 15. Plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas por 6 dias em três concentrações (0,75%, 1,5% e 3,0%) de extrato aquoso de *A. thaliana* não-transformada comparadas com o controle (água). As plântulas de gergelim crescidas em extrato aquoso de arabisidopsis não-transformada tiveram o seu crescimento inibido.

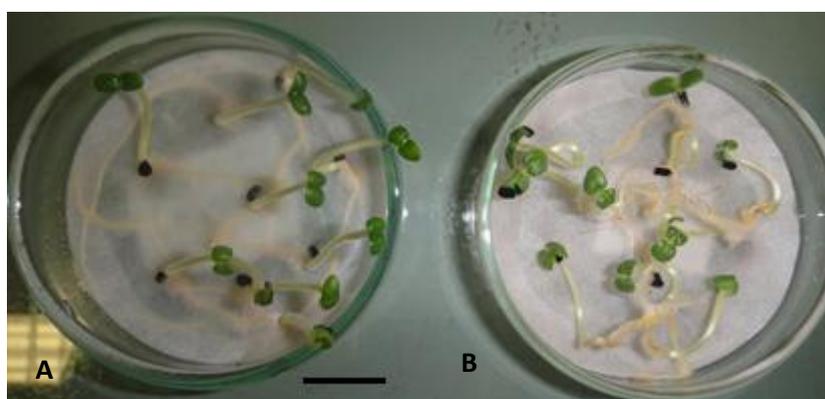


Figura 16. Plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas na ausência e presença do extrato aquoso de plantas não-transformadas de *Arabidopsis thaliana*. A: Plântulas de gergelim crescidas em água (controle positivo). As plântulas cresceram normalmente. B: Plântulas de gergelim crescidas em extrato aquoso de de arabisidopsis não-transformado diluído a 0,75%. As plântulas de gergelim mostraram um menor crescimento e apresentaram uma tendência de gravitropismo negativo no crescimento da raiz. A barra representa 1cm.

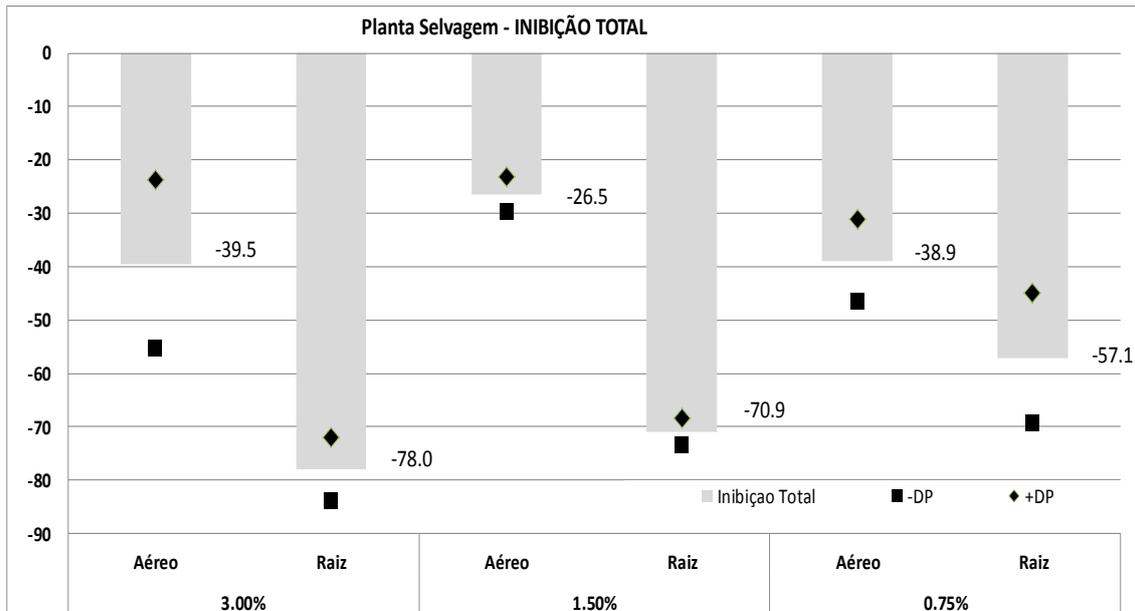


Figura 17. Efeito do extrato aquoso foliar de *Arabidopsis thaliana*, não-transformado no crescimento de *Sesamum indicum*. O extrato foliar inibiu tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com o controle positivo (água).

Subsequentemente, foram feitos bioensaios para estudar o efeito das linhagens de arabis transformadas, a saber, 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM sobre o crescimento de plântulas de gergelim. Em geral, os efeitos das plantas transformadas foram maiores do que aquele observado pelos extratos de plantas selvagens. Para a linhagem 4GA, foram feitos os bioensaios com diluições a 1,5% e 0,75% (Figura 18). As plântulas de gergelim crescidas com extrato foliar 4GA diluído a 1,5% tiveram uma inibição média de 64 % da parte radicular e de 42% da parte aérea maior que a inibição induzida pelo extrato de plantas de arabis não-transformadas (Figura 19). Já o extrato de plantas 4GA a 0,75% induziu uma inibição do crescimento radicular de gergelim de 76% e de 61% da parte aérea comparados com arabis selvagem (Figura 19). É importante dizer que esses resultados se mostraram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O efeito inibitório dos extratos da linhagem 4GA foi claramente maior que os observados em extrato de arabis não-transformada.



Figura 18. Plântulas de *Sesamum indicum* (gergelim) crescidas na presença e ausência dos extratos aquosos de plantas de *Arabidopsis thaliana* não-transformada e transformada da linhagem 4GA. O efeito dos diferentes extratos sobre o crescimento de gergelim nas concentrações 1,5% e 0,75%. O efeito inibitório dos extratos da linhagem 4GA foi claramente maior que aquele observado nas plântulas de gergelim crescidas em extrato de arábido não-transformado.

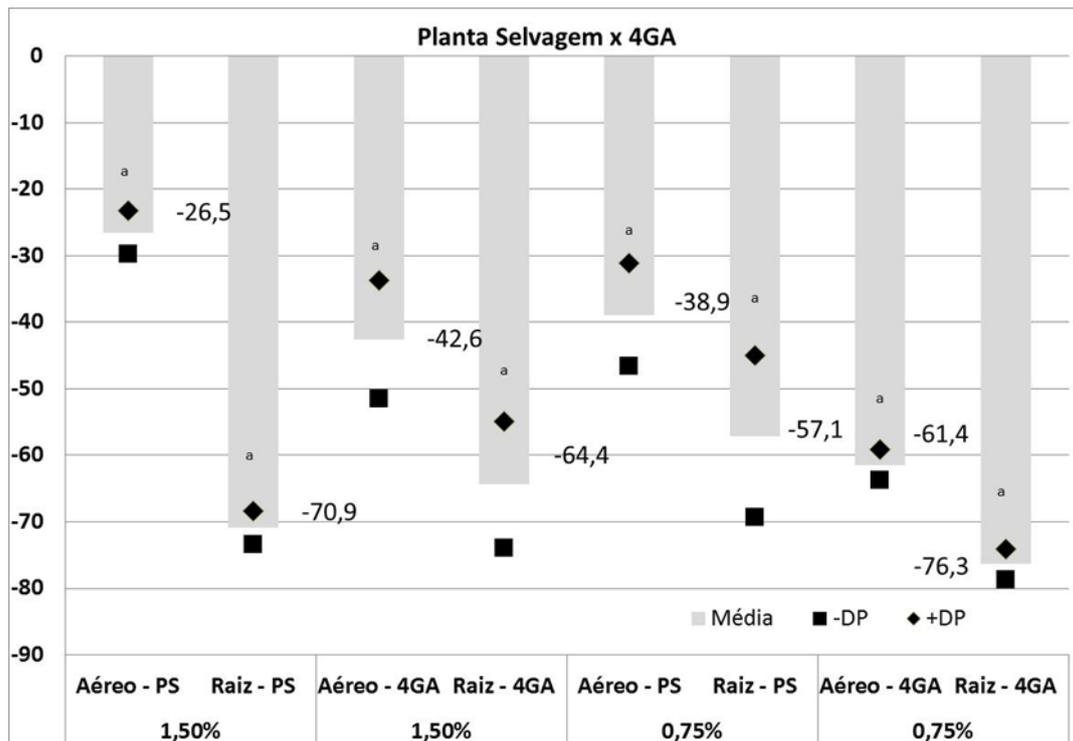


Figura 19. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em duas concentrações (1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GA e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GA inibiu mais tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância.

Semelhantemente à 4GA, o bioensaio com a linhagem transgênica 4GB foi feito com as diluições 1,5% e 0,75%, cujo aspecto geral das plântulas de gergelim pode ser visto na Figura 20. As plântulas de gergelim submetidas ao extrato foliar de arabisopsis 4GB diluído a 1,5% cresceram 88 % (sistema radicular) e 65% (caule) a menos que aquelas tratadas com extrato de arabisopsis não-transformado (Figura 21). A diluição 0,75% do extrato de plantas 4GB resultou em uma inibição de 90% e de 69% do sistema radicular e aéreo, respectivamente (Figura 21). É importante dizer que esses resultados se mostraram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

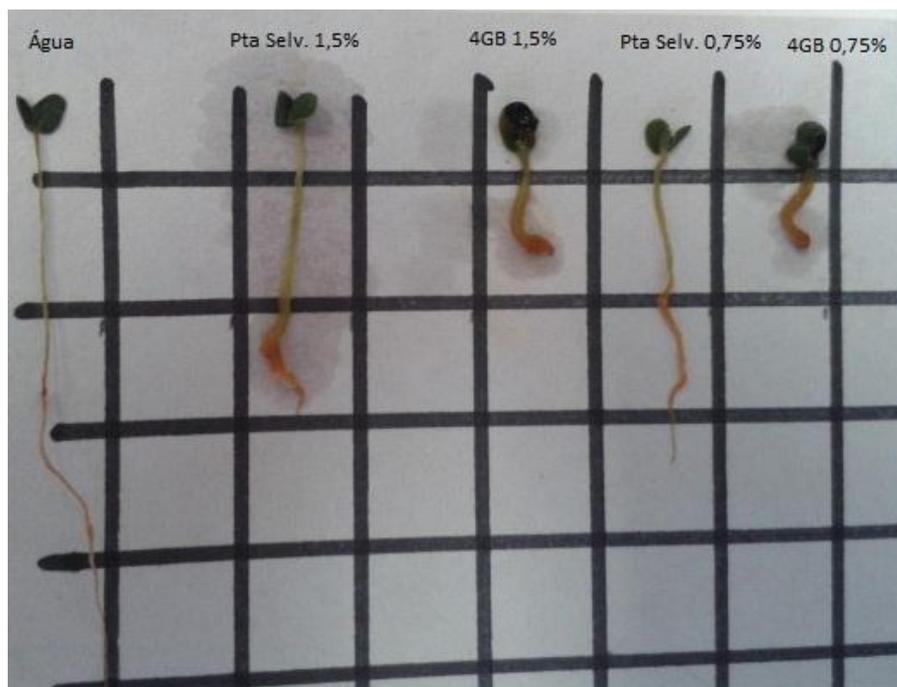


Figura 20. Plântulas de *Sesamum indicum* crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *A. thaliana* transformada da linhagem 4GB. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GB diluído a 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento menor do que as plantas controles.

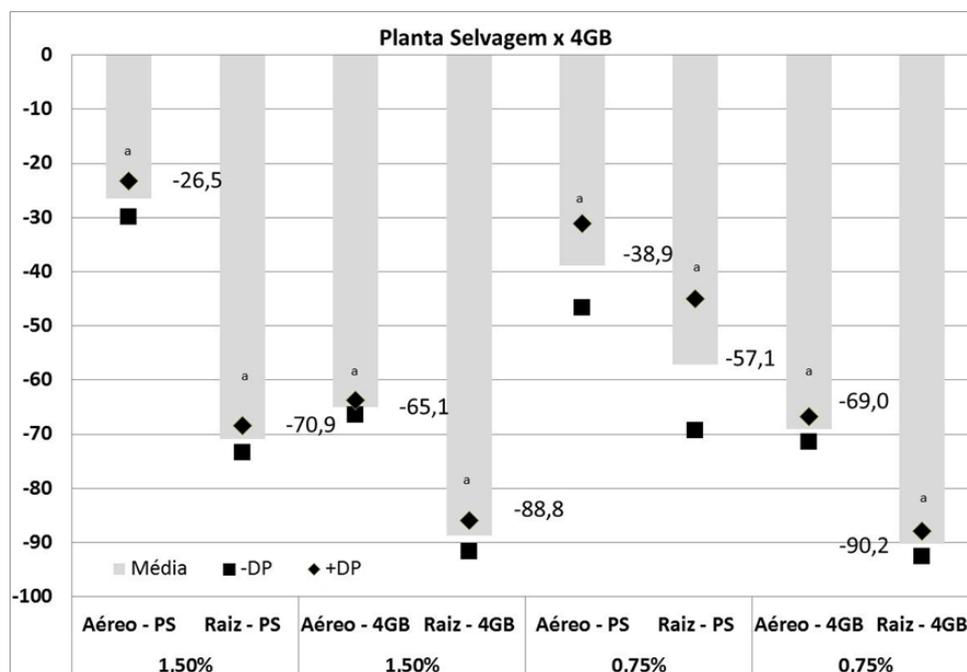


Figura 21. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em duas concentrações (1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GB e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GB inibiu mais tanto o crescimento da parte aérea quanto radicular quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de nível de significância.

Outra linhagem de *arabidopsis* transgênico analisada foi 4GC, cujo bioensaio foi feito com as seguintes diluições do extrato: 3%, 1,5% e 0,75%. Embora se perceba um processo inibitório, a diferença entre *arabidopsis* transgênico e selvagem não foi tão explícita quanto nas linhagens anteriores (Figura 22). Plântulas de gergelim tratadas com extrato de 4GC diluído a 3% tiveram uma inibição do crescimento radicular média de 48 % e de 21% do sistema aéreo comparado com *arabidopsis* não transgênico (Figura 23). As outras diluições do extrato 4GC também inibiram o crescimento de gergelim. No extrato 4GC a 1,5% a inibição foi de 84% (raiz) e 66% (caule) e a diluição 0,75% resultou na menor inibição, 5,5% e 40% para raiz e caule, respectivamente (Figura 23). É importante dizer que esses resultados se mostraram estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$) nas concentrações 3 e 1,5% da parte aérea e em todas as concentrações (3; 1,5 e 0,75%) na parte radicular.



Figura 22. Plântulas de *Sesamum indicum* crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *Arabidopsis thaliana* transformada da linhagem 4GC. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GC diluído a 3%; 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento diferente das plantas controles.

O bioensaio da amostra 4GD foi realizado com diluição do extrato a 0,75%. Comparando-se com o extrato de *arabidopsis* não transgênico, o extrato de plantas 4GD inibiu o crescimento médio das plântulas de gergelim de 82 % e 65% do sistema radicular e caulinar, respectivamente (Figura 24). Essas diferenças são estatisticamente diferente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

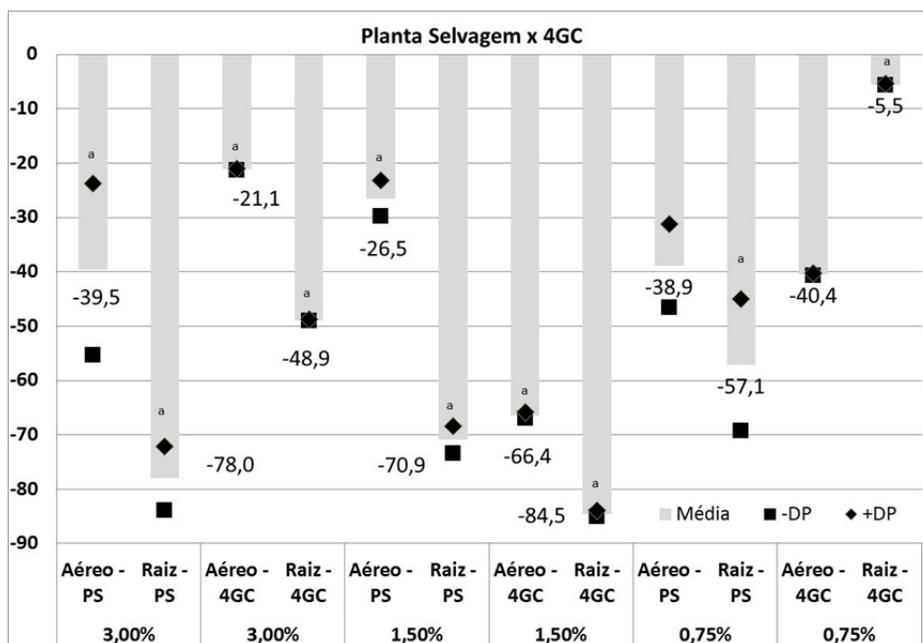


Figura 23. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em três concentrações (3; 1,5 e 0,75%) do extrato aquoso da amostra 4GC e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GC inibiu mais o crescimento da parte radicular do que o crescimento aéreo quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de nível de significância.

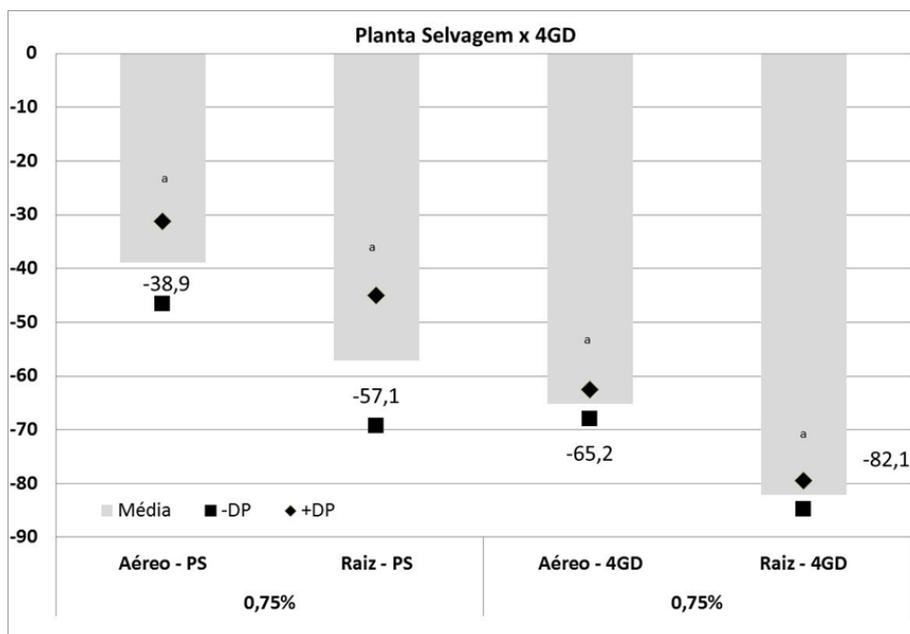


Figura 24. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado em na concentração 0,75% do extrato aquoso da amostra 4GD e do Gergelim germinado na mesma concentração do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GD inibiu tanto o crescimento da parte radicular quanto aéreo quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de nível de significância.

A última linhagem de arabidopsis transgênico foi a 4GM. O bioensaio com esta linhagem foi realizado com as diluições de 3,0%, 1,5% e 0,75% (Figura 25). O crescimento médio das plântulas de gergelim germinadas e crescidas na presença do extrato de plantas 4GM a 3% foi inibido 64 % na raiz e 72% no caule comparado com o extrato de plantas selvagens (Figura 26). A 1,5%, a inibição do crescimento radicular foi de 82% e caulinar de 70% e o extrato 0,75% inibiu 60% (raiz) e 26% (caule) (Figura 28).

A análise estatística comparativa dos resultados do bioensaio com a linhagem 4GM e selvagem revelou diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) entre si nas concentrações 3 e 1,5%.



Figura 25. Plântulas de *Sesamum indicum* crescidas na presença ou ausência de extrato aquoso de *A. thaliana* transformada da linhagem 4GM. As plântulas de gergelim crescidas nas concentrações do extrato foliar da linhagem 4GM diluído a 3%; 1,5% e 0,75% tiveram um crescimento diferente das plantas controles.

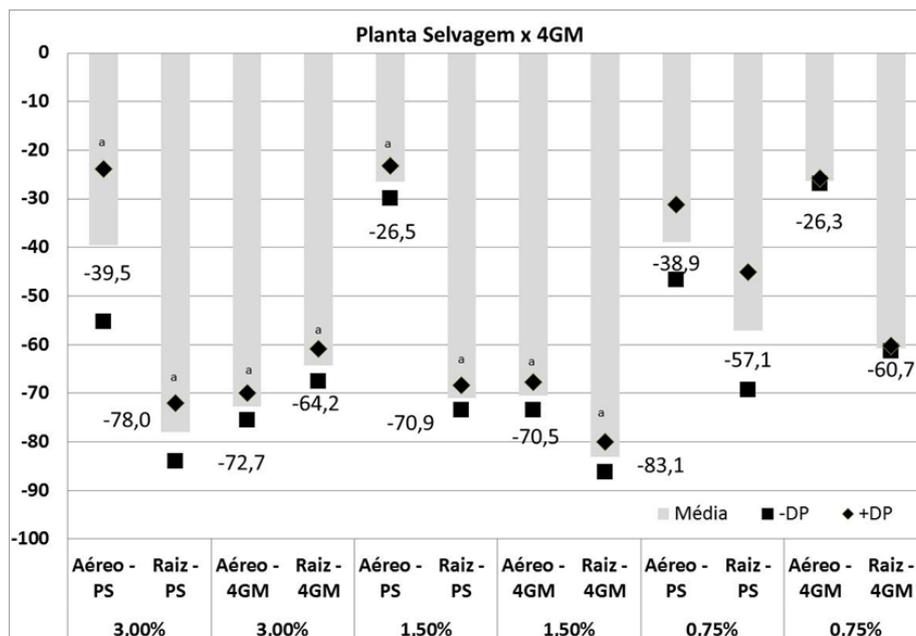


Figura 26. Crescimento da parte aérea e radicular do Gergelim germinado nas concentrações 3; 1,5 e 0,75% do extrato aquoso da amostra 4GM e do Gergelim germinado nas mesmas concentrações do extrato aquoso da planta Selvagem. Como controle utilizou-se água. O extrato foliar da linhagem 4GM inibiu tanto o crescimento da parte radicular quanto aérea das inibições 3 e 1,5% quando comparados com a inibição causada pelo extrato aquoso da planta não-transformada. Médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 5% de nível de significância.

A Figura 27 mostra o tempo de germinação em cada amostra nas suas devidas concentrações. Os bioensaios revelaram um aumento no tempo de germinação das sementes submetidas aos extratos de arabidopsis comparadas com aquelas germinadas em água. O tempo médio de germinação em água foi de 25,6 h e nos extratos o tempo de germinação variou de 30 a 60 h. O extrato que apresentou germinabilidade mais tardia foi o 4GD 0,75% que levou 58,4 h para que todas as sementes germinassem. Esse resultado também corrobora com a ação alelopática intensificada causados pela amostra 4GD.

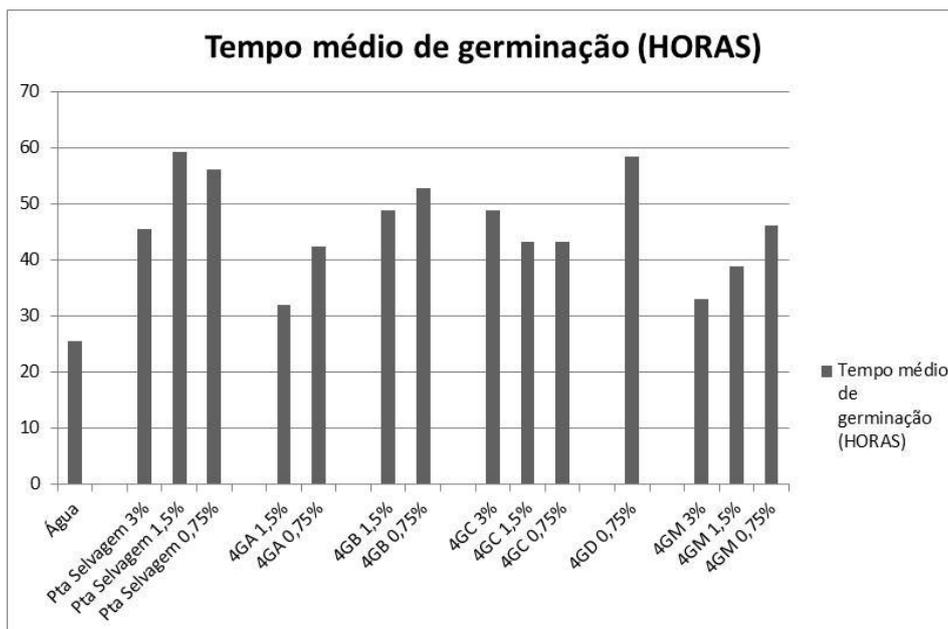


Figura 27. Tempo médio de germinação das sementes crescidas sobre extrato aquoso das amostras transgênicas 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM e água como controle. Houve um aumento no tempo de germinação das sementes sobre os extratos das plantas transgênicas em comparação com as sementes que cresceram sob a água.

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudos de Expressão dos genes GGR, GGPS2 e GGPS6 em *A. thaliana*.

A análise das PCR em tempo real se baseou na obtenção das curvas-padrão das diversas formas de GGPS. De acordo com Pfaffl (2004), para a obtenção de uma boa curva-padrão, a eficiência da PCR em tempo real é um marcador essencial no processo de quantificação da expressão de um gene através de RTq-PCR e esta eficiência deve estar sempre em 100%, podendo variar 20% para mais ou para menos. Adicionalmente, a eficiência de amplificação deve ser constante em todas as amostras de comparação entre amostras conhecidas e desconhecidas e o valor do slope (inclinação) deve variar entre -3,6 e -3,1 (Pfaffl 2004). Os genes GGPS2 e GGPS6 tiveram uma boa eficiência de amplificação, portanto os resultados dessa se mostram confiáveis. Em função da não obtenção de nenhuma linhagem transgênica contendo GGPS2 e GGPS6, foi feita apenas comparação de *ct* (*cycle threshold* – início da fase exponencial da curva) das plantas com a superexpressão do gene GGR para análise de número de cópias dos genes nessas plantas transformadas em relação ao DNA plasmidial.

Em quatro, das cinco amostras transgênicas o número de cópias foi muito parecido com o das amostras realizadas com o DNA plasmidial. Uma das amostras, 4GD apresentou menor número de cópias, o que nos revela um maior número de transcritos desse gene. Esse resultado sugere que essa planta pode ter tido maior número de inserções do transgene GGR. Esse resultado de PCR em tempo real corrobora com o resultado obtido através do bioensaio, onde a amostra 4GD apresentou uma inibição de aproximadamente 27% maior que a inibição apresentada pela planta selvagem.

Outro fator a ser considerado é que as diversas formas do gene GGPS devem ter um padrão específico de expressão, muitas vezes associados com a fase de desenvolvimento da planta, tecidos, estímulos ambientais entre outros fatores. De acordo com KLIEBENSTEIN (2004), os genes envolvidos na síntese de terpenos em *arabidopsis* possuem diversificados padrões de expressão e se expressam em vários órgãos da planta. Contudo, tem-se que considerar que no caso das linhagens transgênicas que carregam o gene GGR estes fatores podem não ter a importância que têm em plantas selvagens. O gene introduzido nessas plantas estão sob controle de um promotor, o CaMV 35S, que não depende dos fatores supracitados para expressar o

gene. Assim, em princípio, mesmo que apenas uma cópia desse gene tenha sido introduzida nas linhagens de arábido, é esperado que os níveis de expressão do geranyl geranyl difosfato sintase seja maior nessas plantas que naquelas não-transformadas. Esse fato é suportado pelo maior efeito inibitório sobre o crescimento e desenvolvimento de plântulas de gergelim das plantas contendo GGR quando comparadas com as selvagens.

Porém, está claro que, em função das dificuldades na obtenção da curva padrão do gene GGR, não se pode fazer a comparação direta entre *A. thaliana* transgênico e selvagem. Assim, é fato que no caso de GGR outras técnicas de estudo da expressão gênica podem ser necessárias para avaliar os níveis de expressão desse gene como, por exemplo, PCR em tempo real relativo e Northern Blots.

O fato de as análises de PCR em tempo real revelar que o gene GGR foi sempre expresso em níveis facilmente detectáveis, não descarta uma hipótese de silenciamento deste via algum mecanismo de co-supressão nas amostras transgênicas. Em todas as amostras das plantas contendo GGR, foi possível confirmar que este gene estava ativo e não suprimido, porém, ainda existe a probabilidade de um silenciamento pós-traducional. Essas considerações são procedentes porque em alguns estudos de superexpressão gênica se verificou, inesperadamente, o estabelecimento de um processo de silenciamento. NAPOLI et al. (1990) tentaram obter a superexpressão do gene da *chalcone synthase* (CHS) responsável pela pigmentação das pétalas de Petúnia, que também está envolvido na biossíntese de flavonoides, flavonas, isoflavonóides e antocianinas, os quais são metabólitos secundários. Nesse estudo, ao invés de superexpressar o CHS, o que realmente ocorreu foi a supressão do produto final da expressão desse gene. O silenciamento gênico é um processo natural, cujo mecanismo de degradação do mRNA é decorrente de sua homologia com o RNA exógeno introduzido na planta.

Como observado, o padrão de expressão dos genes geranyl geranyl difosfato sintase (GGPS), cruciais na síntese de terpenos, ainda não foi totalmente elucidado e há muito o que se investigar nesse campo. É fato que os resultados presentes neste trabalho fortemente sugerem uma conexão direta entre a síntese de terpenos e compostos alelopáticos. As plantas transgênicas também possuem efeitos alelopáticos e a análise de PCR em tempo real nos ajudou na melhor elucidação dos resultados, onde houve um

maior número de cópias do gene GGR houve também um maior efeito alelopático sobre o crescimento do Gergelim (*Sesamum indicum*).

5.2 Efeito do extrato aquoso de *A. thaliana* sobre plântulas *Sesamum indicum* (Gergelim).

Os dados mostraram que os bioensaios realizados com extrato aquoso de *A. thaliana* tiveram efeito negativo sobre o crescimento das partes aéreas e radiculares de plântulas de gergelim. Além disso, observou-se que a resposta gravitrópica da raiz dessas plântulas foi invertida. Esses fatos indicam que o extrato de arábido tem um efeito fitotóxico sobre plântulas de gergelim. Os resultados obtidos mostram que o extrato foliar de arábido foi capaz de induzir uma inibição de 78% do crescimento da raiz e 39,5% do caule. O fato de arábido possuir efeito alelopático sobre plântulas de gergelim ser importante, talvez inédito, é interessante pelo padrão de fitotoxicidade que foi similar ao observado em outras plantas.

Em adição, a resposta gravitrópica alterada visto em raízes de gergelim sob o extrato aquoso de *A. thaliana* em concentração de 0,75% parece ser frequente em respostas alelopáticas. Esse efeito não pode ser muito bem analisado nas outras concentrações devido ao baixo crescimento do sistema radicular. Esse efeito foi observado também em estudos realizados por CHON, et al. (2000) trabalhando com extratos de alfafa, OLIVEIRA et al. (2004) com o extrato aquoso de folhas de *Solanum lycocarpum* e PINA et al. (2009) com extratos de *Eugenia dysenterica* que induziram a inversão do crescimento das raízes das plantas alvo. Segundo os autores, a inversão da raiz, seria uma forma desta evitar o contato com as substâncias aleloquímicas. Também se notou que o crescimento das partes radiculares foi mais afetado que o crescimento das partes aéreas. Enquanto a parte radicular foi inibida 77% sob o extrato aquoso 3%, a parte aérea sofreu uma inibição de 39%, sob o mesmo extrato. Esse fenômeno já havia sido relatado no crescimento de *Sesamun indicum* L. sob efeito de extrato de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) (OLIVEIRA et al., 2004) e também no efeito de crescimento de plantas sob extratos de *Medicago sativa* L. (CHON et al., 2000). Em revisão bibliográfica não foi constatado nenhum estudo que comprove esse efeito através de solução aquosa feita com planta jovem de *A. thaliana*.

Bioensaios realizados com extrato de solvente orgânicos (etanol) da espécie *Stryphnodendron adstringens* dessa espécie revelaram até 72% de inibição da germinação e do crescimento *Bidens pilosus* (SILVA et al., 2006). Este mesmo estudo revelou que os compostos inibidores presentes nessa espécie contém terpenóides. Contudo, como a quantidade de material obtida nesse estudo foi pequena, não possibilitou a identificação do composto. Esse resultado sugere fortemente que Terpenóides estão envolvidos em processos alelopáticos, assim é grande a possibilidade que terpenóides possam estar diretamente relacionados com os efeitos dos extratos de *A. thaliana* sobre plântulas de gergelim.

Os dados obtidos com os bioensaios realizados com as amostras de extrato aquoso das plantas transgênicas dão suporte à associação entre terpenóides e alelopatia. Assim, é importante observar que as plantas com maior número de transcritos do gene GGR mostraram um efeito alelopático sobre plântulas de gergelim maior que aquele observado com as plantas não transformadas. As amostras 4GB e 4GD foram as que mostraram efeito alelopático significativamente maior. Já as amostras 4GA, 4GC e 4GM também apresentaram um alto efeito alelopático, porém, esses resultados foram mais próximos aos obtidos com a planta selvagem.

É importante observar que os padrões de inibição de *A. thaliana* sobre gergelim mostraram que o crescimento da parte radicular foi mais afetado, assim como as alterações da resposta gravitrópica. Esses resultados são consistentes com as respostas alelopáticas observadas com extratos de plantas com comprovado efeito alelopático, como é o caso de *S. adstringens*, que tem um efeito inibitório em até 72% no crescimento da alface (SILVA et al., 2006), e o *Solanum lycocarpum* que mostrou alta inibição no crescimento do gergelim através de seus extratos (OLIVEIRA, 2004). Os efeitos sobre as plântulas de gergelim tratadas com extrato de arábido selvagem foram compatíveis em intensidade com aqueles vistos com outras plantas já citados, portanto, é possível inferir que *A. thaliana* possa ser considerada uma espécie alelopática.

Além disso, nas plantas transformadas os efeitos alelopáticos foram mais contundentes que aqueles observados com plantas selvagens. O gene GGR, transferido para as linhagens 4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM expressa a enzima *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase* (DXPS) que se encontra na base da rota de síntese de terpenóides

(LANGE & GHASSEMIAN, 2002), o que suporta a afirmação anterior que associa terpenóides e compostos alelopáticos, o que também foi observado em *S. adstringens* (Silva et al, 2006).

Além do fato de que esse trabalho diretamente conecta a produção de terpenóides com a indução de respostas alelopáticas em plantas-alvo, como vistos nos bioensaios, um importante campo de investigação foi aberto. Com base nesses resultados, estudos moleculares que envolvem a expressão das diferentes formas de GGPS em outras plantas podem resultar em plantas que tenham efeitos alelopáticos mais intensos, ou mesmo a produção de compostos com efeito de bioherbicida. Os herbicidas naturais podem ser considerados muito importantes economicamente, além de não existirem estudos que os associem a danos à saúde humana. Contrariamente, os agroquímicos, que atualmente têm sido utilizados nas lavouras, podem causar danos principalmente à microbiota do solo, vertebrados em geral e muito provavelmente ao homem. Como exemplo, LAJAMANOVICH et al. (2012) verificou que o uso de agroquímicos tem causado a morte de embriões de anfíbios que entram em contato com o glifosato®, um dos agroquímicos mais comumente usados na agricultura. De acordo com os autores, estes estudos também serão estendidos a outras espécies e visando conhecer melhor os seus efeitos sobre o homem, que sem sombras de dúvidas está entre os maiores consumidores de produtos tratados com herbicidas.

De acordo com CARRASCO (2011), o uso indiscriminado do glifosato e outros agroquímicos em regiões do Paraguai e Argentina pode estar diretamente relacionado com malformação embrionária não só em anfíbios, mas em aves (galinhas) e mamíferos (ratos), além de abortos em seres humanos. Estudos revelaram que altas doses de glifosato aumentam os níveis de ácido retinóico no sangue das mães pode ser a origem destes problemas. Adicionalmente, a frequência destes fenômenos ocorre em regiões onde uso desses agroquímicos é maior.

Apesar de aparentemente plantas transgênicas serem melhor opção que plantas naturais tratadas com herbicidas químicos, o uso de plantas transgênicas ainda é motivo de muitas controvérsias. Para que uma espécie transgênica seja liberada para o consumo humano, muitos estudos devem ser realizados, como foi o caso do feijão transgênico desenvolvido pela Embrapa (DINIZ, 2011). Este possui resistência ao vírus mosaico

dourado, praga mais importante dessa cultura agrícola no Brasil. Porém, esses estudos duraram mais de 10 anos até que o uso comercial desse feijão fosse aprovado pela CTNBio (DINIZ, 2011).

Assim, mais estudos nessa linha de pesquisa são necessários a fim de comprovar uma associação direta entre os genes precursores de terpenóides e compostos alelopáticos. Além disso, estudos para definir a melhor idade de liberação desses componentes na planta de interesse podem ser de grande valia, além de estudos de estabilidade do gene e dos prováveis efeitos alelopáticos em próximas gerações. As amostras 4GD e 4GM foram as que mais tiveram efeitos alelopáticos, portanto, as que devem receber atenção especial em estudos de estabilidade de efeitos. Outro estudo de grande importância para o seguimento desse trabalho é o silenciamento dos genes através de RNA interferente, o que pode dar ainda mais suporte a ideia de que a produção de terpenóides é essencial no processo de alelopatia em plantas.

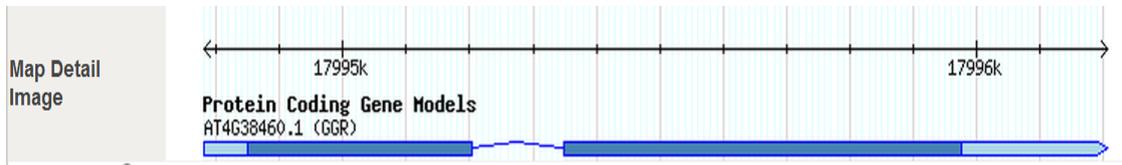
6. PLANO DE PUBLICAÇÃO

Os resultados obtidos através desse trabalho são de grande relevância para a comunidade científica. Portanto, poderão ser publicados nas seguintes revistas: Revista Brasileira de Botânica, Acta Botânica, Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento.

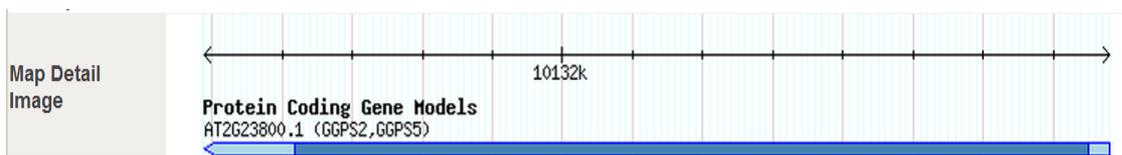
Os resultados parciais desse trabalho foram apresentados ao ENBOC – Encontro de Botânicos do Centro-Oeste Julho de 2012 e ao VII Simposio Internacional de Quimica de Productos Naturales y sus aplicaciones, Universidade de Talca – Chile, Novembro de 2012.

7. ANEXOS

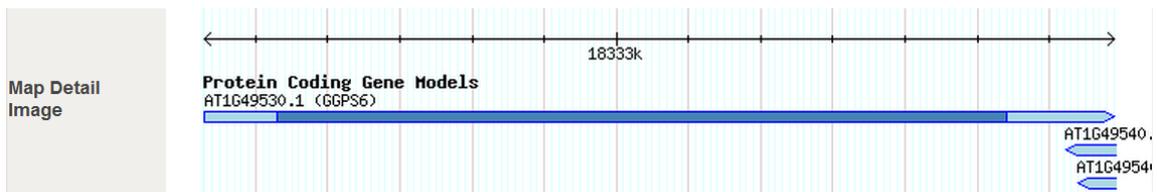
Anexo 1: Sequencia gênica GGR. Fonte: TAIR, 2012. Presença de 2 Éxons. 1425pb. 1,85kb



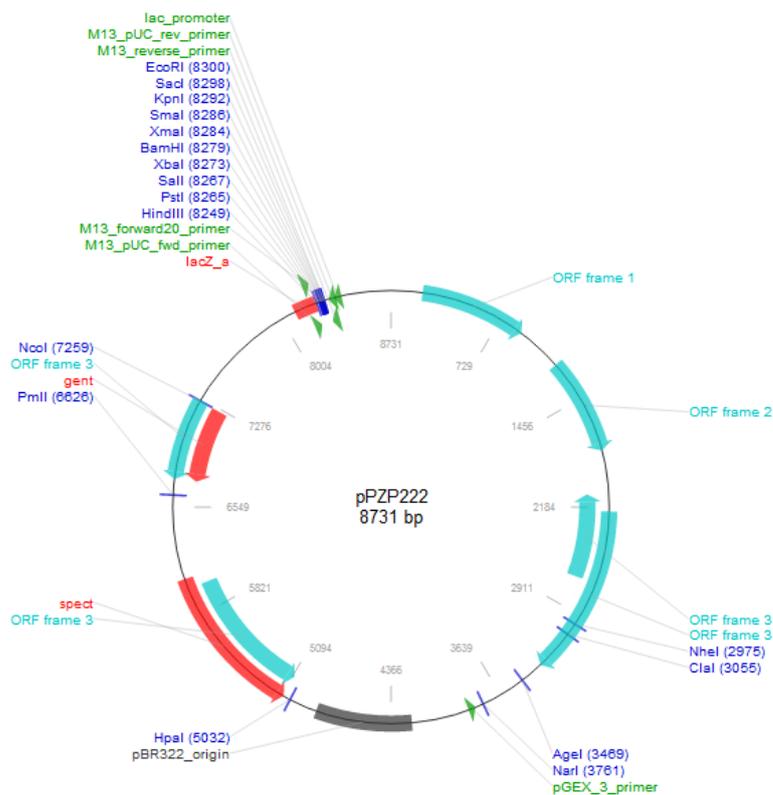
Anexo 2: Sequencia gênica GGPS2. Fonte: TAIR, 2012. Presença de 1 Éxon. 1679 pb. 1,68kb.



Anexo 3: Sequencia gênica GGPS6. Fonte: TAIR, 2012. Presença de um Éxon. 1639pb. 1,64kb.



Anexo 4: Vetor binário com o marcador Gentamicina. Fonte: Addgene, 2012.



Anexo 5: Tabela com seqüência dos primers

Nome do primer	Seqüência	Temperatura de anelamento
GGR Reverse	5' AGGATCG TCGTCCATACAGG 3'	63.9°C
GGPS2 Reverse	5' CTCCTTCGCCGTAGACTTTG 3'	63.8°C
GGPS6 Reverse	5' ACAAGTCCCTCTGTCCCAAC 3'	63°C
pYL436 Forward	5' GCCG GTCTAGGTATTTTTACAAC 3'	61.8°C
GGR senso	5'GTCGGGATGCTGTATCAGGT3'	63.9°C
GGR antisenso	5'GAATGGTCAAGCGAAG AAGC3'	63.8°C
GGPS2 senso	5'CGAGCTAGTAGGTGGCCAAG3'	63.8°C
GGPS2 antisenso	5'CTCCTTCGCCGTAGACT TTG3'	63.8°C

GGPS6 senso	5'TCGCTCATCCTAGACGACC T3'	63.9°C
GGPS6 antisenso	5'CCTCTGTCCCAACAGCTCTC3'	64.1°C

Anexo 6: Sequência em formato FASTA do gene GGR de *Arabidopsis thaliana*. Fonte: NCBI

```
>gi|240256243:17994781-17996205 Arabidopsis thaliana chromosome 4,
complete sequence
GGCTGAACCCAATTTTACTAAATTATCATTATCTCAAACACAACAAGGATAGATCATCCTCATAGGCGAT
GTTGTTTAGTGGTTCAGCGATCCCATTAAGCAGCTTCTGCTCTCTTCCGGAGAAACCCACACTCTTCCT
ATGAAACTCTCTCCCGCTGCAATCCGATCTTCATCCTCATCTGCCCGGGTTCGTTGAACTTCGATCTGA
GGACGTATTGGACGACTCTGATCACCGAGATCAACCAGAAGCTGGATGAGGCCATAACCGTCAAGCACCC
TGCGGGGATCTACGAGGCTATGAGATACTCTGTACTCGCACAAAGGCGCCAAGCGTGCCCCCTCTGTGATG
TGTGTGGCGGCTGCGAGCTCTTCGGTGGCGATCGCCTCGCCGCTTTCCCCACCGCCTGTGCCCTAGAAA
TGGTGAGATAGATTCCACTCTCTCTCGCCTTGTAATCTCAATTTCCGCGTTAGTGTGTTGATATGAGTGAG
TAAGAAGAAGAAATAGAAAGTCTTTGTTGTTGTTGTTGTTGAGAGATGTGTGTGTTGTATCTAATAATGGAAT
GAATCAGGTGCACGCGCTTCGTTGATACACGACGACCTCCCCTGTATGGACGACGATCCTGTGCGCAGA
GGAAAGCCATCTAACCACACTGTCTACGGCTCTGGCATGGCCATTCCTCGCCGGTGACGCCCTCTTCCCAC
TCGCCTTCCAGCACATTGTCTCCACACGCCTCCTGACCTTGTTCCCGAGCCACCATCCTCAGACTCAT
CACTGAGATTGCCGCACTGTGCGCTCCACTGGTATGGCTGCAGGCCAGTACGTCGACCTTGAAGGAGGT
CCCTTCTCTTTTCTTTGTTTCAGGAGAAGAAATTCGGAGCCATGGGTGAATGCTCTGCCGTGTGCGGTG
GCCTATTGGGCGGTGCCACTGAGGATGAGTCCAGAGTCTCCGAAGGTACGGGAGAGCCGTGCGGATGCT
GTATCAGGTGGTCGATGACATCACCGAGGACAAGAAGAAGAGCTATGATGGTGGAGCAGAGAAGGGAATG
ATGGAAATGGCGGAAGAGCTCAAGGAGAAGGCGAAGAAGGAGCTTCAAGTGTGTTGACAACAAGTATGGAG
GAGGAGACACACTTGTTCCTCTCTACACCTTCGTTGACTACGCTGCTCATCGACATTTTCTTCTTCCCCT
CTGATTTTGGGCCCTCTTTTACATTTGGGCCCTTCTTTCGCTATACGAAATTAGGCCCTGTAATGGACTGT
GTATCGTTTCAATTTTACCCAGAGCTTCTTTCGCTTGACCATTTCATCTTTCGCTACCACCTGTCAATTATCAT
TGTTTTTTTTTTGTGTGCGCCATGTCAAAATCATTTAGTTACTACATGTACTTTTAACCAATTTATAGC
AATCTACTATGTATGTATTTATTTA
```

Anexo 7: Sequência em formato FASTA do gene GGPS2 de *Arabidopsis thaliana*. Fonte: NCBI

```
>gi|240254678:c10132779-10131489 Arabidopsis thaliana chromosome 2,
complete sequence
ATAGAAATTTTGATTTGATTTTGATGAAAAATGGAACCACAAATTCCTTTTTCTCTATCTCTCACTCTTCA
TTCTCTCCCTAAACTTCTTCTTACGAATCTTAAACCAAGGCTAGTCCGCCTCTTCCAGCCTTCTTTAGA
ATCTCGTGTCAAGACCGCTCTTTTATCCCGAAAGGAAGTAGCCGCGTTTCTTGATTCTCCCATTTGTCGAA
GACGAAGAAGGCGAAGAAAAGAGAAGAGGAAGAAGAAGGAGGTATCGTTTCAAATGCCAATTTACGTTTG
AGTTTGATCCATACATGATGAGCAAAGCCGAATCAGTGAACAAAGCTCTAGAAGAAGCAATTCAGTCGG
AGAGCCACTCAAGATTCATGAAGCCATGCGATACGCGATTCTTGCGGCTGGAAAACGTGTTAGGCCAATA
CTCTGCCTTGCTTCTTTCGAGCTAGTAGGTGGCCAAAGAAAATGCGGCAATGCCCGCCGCTTGTGCGGTTG
AGATGATCCACACGATGTCTCTAATCAAAGACGATTTGCCTTGATGGACAACGACGATTTGCGTCTGTGG
AAAGCCCACGACGCACAAAGTCTACGGCGAAGGAGTTGCCATTCCTCTCTGGTGGGGCTCTCTTGTCTCTT
GCCTTTGAGCACATGACCACCGCTGAAATATCCTCGGAGAGAATGGTTTGGGCGGTGAGAGAATTGGCTA
GGTCTATTGGACAAGAGTTTAGTCGCGGACAAGCGATGGATATAAGCAGTGAAGTTTGGACTTAAA
CGAGGTGCGATTAGAGCATTTGGAGTTTATCCATGTTTCATAAAACCGCGTTTTTGTGGAACTGCCGCG
GTTCTTGGCGCCATAAATGGTGGTGGATCTGATGAAGAGATTGAAAGTGTGAGAAAGTTTGAAGGTGCA
```

TTGGATTGTTGTTTCAGGTGGTGGATGATATTTTGGACGAGACGAAGTCGTCGGAGGAATTGGGAAAAAC
CGCCGGGAAAGATCAGCTCGCCGGAAAGCTAACGTATCCAAAGTTGATAGGGTTGGAGAAATCGAAAGAA
TTTGTAAAGAGATTGACGAAAAGATGCACGGCAACATCTTCAAGGGTTTAGTTCTGAAAAGGTTGCTCCTT
TAGTAGCTCTTACTACTTTTATTGCTAATAGAAAATAAGTGATTATATATTTGTTTTGTTTGTGTGTGTTG
GGTTTATGTATACATGCTAAAAGTAGTGTGTCCCTTATTTTTAAGTGTAACCACATTTTAAAGATGTTTAT
TAATGAATATTTAAAAATGTACATAATTTTT

Anexo 8: Sequência em formato FASTA do gene GGPS6 de *Arabidopsis thaliana*. Fonte: NCBI.

```
>gi|240254421:18332429-18333689 Arabidopsis thaliana chromosome 1,  
complete sequence  
TTGTATTAGAGGCTAATGAAGAACTTTACATTATTTTGGTGTACTATTAGATATAAACACAACCTCAAT  
AAAGTTTACTTGCCTGTAACATAATCATCATGCGCCGCGTTACAGTCTGATTCTGTCTGCAATGCGGC  
TAATACGACCGTCCAACCGCGTCTAAGTTCGATCGCAAGCTCCGACTCTGAGTTCATTTCATAACATGAA  
GAATAAGGCTAAGTCCATCAACAAAGCACTAGACAATTCAATTCCTCTTTGCAACAATTTTGTTCCTCTT  
TGGGAGCCAGTACTCGAGGTTACAAAAGCTATGAGGTACACGCTTCTCCCAGGCGGAAAACGAGTAAGGC  
CAATGCTCTGTTTGGTCGCTTGCAGCTCGTAGGTGGCCAAGAGTCAACCGCAATGCCAGCAGCCTGTGC  
GGTTGAGATGATTCACGCAGCGTCGCTCATCCTAGACGACCTTCTTGTATGGATGACGACAGCCTCCGC  
CGTGGAAAACCCACCAACCATAAAGTTTTTGGCGAGAAAACATCCATCTTGGCCTCTAATGCGCTCAGGT  
CTTTGGCCGTC AAGCAGACATTGGCATCGACCTCATTTGGGGTGACTTCAGAGAGGGTTCTTCGGGCTGT  
TCAGGAGATGGCGAGAGCTGTTGGGACAGAGGGACTTGTGGCAGGCCAAGCAGCGGATTTGGCCGGAGAA  
AGGATGAGTTTTAAGAACGAAGACGACGAATTGAGATATCTTGAGTTGATGCATGTTCATAAAACCGCGG  
TTTTGGTTGAAGCTGCGGCTGTTGTGGGAGCTATAATGGGAGGTGGTCTGATGAAGAGATTGAGAGGCT  
TAAGAGCTACGCGAGGTGCGTTGGACTGATGTTTCAGGTGATGGATGATGTACTCGATGAGACCAAGTCT  
TCCGAGGAGCTTGGGAAAAC TGCCGGTAAAGATTTGATCACCGGAAAGCTGACGTATCCGAAGGTGATGG  
GTGTGGACAATGCGAGAGAAATATGCAAAGAGGTTGAACAGAGAAGCGCAGGAACATCTTCAGGGGTTTGA  
TTCTGACAAGGTGGTTCTTTGTTGTCTCTCGCTGATTATATTTGTCAAGAGACAAAAC TACTGTTGCAC  
CATAGCTTAATAATCAATGAAAAGCATCAAAGATGCAAAGCGAGAAAGTTATTTGTTTTGTTTTCTTTT  
AAACGAGGAAAAAAGTGGTTTGTAAACATGTTTCGATTTAGCTAACCAAATTTGCATAAATATTACAA  
T
```

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; KIM, -T. Y.; Ri, M.-B.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A., SCHWAB, W; BOUWMEESTER. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*, vol. 5. N.1. P. 49-58, 2006.

AHARONI, A.; GIRI, A. P.; DEUERLEIN, S.; GRIEPINK, F.; KOGEL, W. J.; VERSTAPPEN, F. W. A. VERHOEVEN, H. A.; JONGSMA, M. A.; SCHWAB, W.; BOUVMEESTER, H. Terpenoid Metabolism in Wild-Type and Transgenic Arabidopsis Plants. *The Plant Cell*. Vol. 15. P. 2866-2884, 2003.

ANDRADE, S. R. M. EMBRAPA CERRADOS (Planaltina, DF). Transformação de plantas. 28p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 102), 2003.

AUBURG, S.; LECHARNY, A.; BOHLMANN, J. Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular genetics and genomics*. P. 730-745, 2002.

BARATA, R. M. Clonagem, caracterização da expressão gênica e do transporte intra-organelar da protease FtsH-p1 de tomate (*Lycopersicon esculentum*). 2003. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Divisão de Biblioteca e Documentação - ESALQ/USP, 2003.

BARBOSA, E. G. G.; LEITE, J. P.; MARIN, S. R. R.; MARINHO, J. P.; CARVALHO, J. F. C.; PAGLIARINI, R. F.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; GUIMARÃES, F. C. M.; OLIVEIRA, M. C. M.; SHINOZAKI, K. Y.; NAKASHIMA, K.; MARUYAMA, K.; KANAMORI, N.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, T.; NEPOMUCENO, A. Overexpression of the ABA-Dependent *AREB1* transcription factor from *Arabidopsis thaliana* improves soybean tolerance to water déficit. *Plant Mol Biol Rep*. Vol. 31. P. 719 – 730, 2013.

BASTOLLA, F, M. Seleção e avaliação de genes de referência para estudos de expressão gênica em *Eucalyptus*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – UFRGS, 2007.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Biochemistry. Vol. 95 N.8. P. 4126-4133, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Agrobacterium: Um sistema natural de transferência de genes para plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ano 3 N. 15 P. 12-15, 2000.

BROWN, T. A. Clonagem gênica e análise de DNA. 4. Ed. São Paulo: Artmed, 2003.

BUENO, M. R. P. O Projeto Genoma Humano. *Bioética*. Vol. 5. N. 2, 2009.

BUSTIN, S. A. Absolute Quantification of mRNA using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. Academic Department of Surgery, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine and Dentistry. Queen Mary and Westfield College. London. 2000.

CARRASCO, A. E. El glifosato: ¿es parte de un modelo eugenésico? Glyphosate: part of a eugenics model? Salud Colectiva. Vol. 7 N. 2 P. 129-133. Buenos Aires, 2011.

CARRETERO-PAULET, L.; CUNILLERA, N.; RODRI, M.; FERRER, A.; BORONAT, A.; CAMPOS, N. Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-Deoxy- D -Xylulose 5-Phosphate reductoisomerase , the first committed enzyme of the 2-C-Methyl- D -Erythritol 4-Phosphate Pathway 1. Society, Vol. 129 P. 1581-1591, 2002.

CARTAGENA, J. S. Disección genética del desarrollo de la hoja em *Arabidopsis thaliana*: Estudio de ecotipos y estirpes mutantes de la colección del *Arabidopsis* Information Service. Tese de doutorado. División de Genética, Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, 1998.

CARVALHO, P. G. B.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M. S.; MORTHY, L.; FERREIRA-FILHO, E. X. F. Temperature-dependent germination and endo-b-mannase activity in sesame seeds. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. V. 13 N 2. P. 139-148, 2001.

CHON, S. U.; CHOI, S. K.; JUNG, S.; JANG, H. G.; PYO, B. S.; KIM, S. M. Effects of Alfafa Leaf Extracts and Phenolic Allelochemicals on Early Seedling Growth and Root Morphology of Alfafa and Barnyard Grass. Rev. Crop Protection. Vol. 21. P. 1077-1082, 2002.

D'AURIA, J. C.; GERSHENZON, J. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. Current opinion in plant biology, Vol. 8(3) P. 308-316, 2005.

DELATORRE, C. A.; SILVA, A. A. *Arabidopsis Thaliana*: Uma pequena planta um Grande Papel. Revista de Ciências Agrárias P. 58-67, 2008.

DEWICK, M. P. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 Ed. John Wiley & Sons Ltd. 2002.

DINIZ, F. CTNBio aprova feijão transgênico desenvolvido pela Embrapa. www.embrapa.br/imprensa (15/09/2011, 14:00)

DI STASI, C.L. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: DI STASI, C.L (Org.), Plantas medicinais: Arte e Ciência. São Paulo: Editora UNESP. 1996. P. 108-127, 1996.

DUDAREVA, N.; MARTIN, D.; KISH, C. M.; KOLOSOVA, N.; GORENSTEIN, N.; FÄLDT, J.; ET AL. (E) - β -Ocimene and Myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon : function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. Society, Vol. 15 P. 1227-1241, 2003.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da Ecofisiologia. Rev. Brasileira de Fisiologia Vegetal. Ed. Especial 12 P. 175-204, 2000.

FERREIRA, M. G. R. Transferência de genes em segmentos foliares de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schumm.) usando biobalística. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 39. ISSN 1677-8618. Outubro, 2006.

FERREIRA, M. G. Transferência de genes em segmentos foliares de cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum* Schumm.) usando Biobalística. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Rondônia (Porto Velho, RO). (ISSN 1677-8618; 39), 2006.

FERGUSON, J. J.; RATHINASABAPATHI, B. Allelopathy: How Plants Suppress Other Plants. University of Florida, 2003.

GANDER, E. S.; MARCELLINO, L.H. Plantas transgênicas. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento. Brasília, DF. V.1. N.1. P. 34-37, 1997.

GLEASON, F. K. Plant Biochemistry. Jones & Bartlett Learning. University of Minnesota. 2012.

GOODNER, B.; HINKLE, G.; GATTUNG, S.; MILLER, N.; BLANCHARD, M.; QUOROLLO, B.; GOLDMAN, B. S.; CAO, Y.; ASKENAZI, M.; HALLING, C.; MULLIN, L.; HOUMIEL, K.; GORDON, J.; VAUDIN, M.; LARTCHOUK, O.; EPP, A.; LIU, F.; WOLLAM, C.; ALLINGER, M.; DOUGHTY, D.; SCOTT, C.; LAPPAS, C.; MARKELS, B.; FLANAGAN, C.; CROWELL, C.; GURSON, J.; LOMO, C.; SEAR, C.; STRUB, G.; CIELO, C.; SLATER, S. Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science. Vol. 294. N. 5550. P. 2323-2328, 2001.

HAMANO, Y.; DAIRI, T.; YAMAMOTO, M.; KUZUYAMA, T.; ITOH, N.; SETO, H. Growth-Phase Dependent Expression of the Mevalonate Pathway in a Terpenoid Antibiotic—producing *Streptomyces* Strain. Biosci Biotechnol Biochem. Vol. 66. N. 4. P. 808 – 819, 2002.

HELLENS, R. P.; EDWARDS, E. A.; LEYLAND, N. R.; BEAN, S.; MULLINEAUX, P. M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium* – mediated plant transformation. Plant Molecular Biology. Vol 42. P. 819 – 832, 2000.

IJIMA, Y.; GANG, D. R.; FRIDMAN, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. Society Vol. 134 P. 370-379, 2004.

INRA – Institut Jean-Pierre Bourgin. <http://www-ijpb.versailles.inra.fr/en/index.htm>
29/01/2012 11:21.

KLIEBENSTEIN, D. J. Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. *Rev. Plant, Cell and Environment*. Vol. 27. P. 675-684, 2004.

KREBS, J. E.; GOLDSTEIN, E. S.; KILPATRICK, S. T. *Lewin's Genes X*. Jones and Bartlett Publishers, 2011.

LABORATÓRIOS CAMBIA. Disponível em: <http://www.cambia.org>, Acesso em 22 de Junho de 2011.

LACEY, H. Há alternativas ao uso de transgênicos? *Novos Estudos*. Vol. 78. P. 31-39, 2007.

LAJMANOVICH, R. C.; PELTZER, P. M.; ATTADEMO, A. M.; ZENKLUSEN2M. C. C.; JUNGES, C. M. Los Agroquímicos y su impacto em los anfibios: um dilema de difícil solución. *Química Viva*. N. 3. Ano 11, 2012.

LANDMANN, C.; FINK, B.; FESTNER, M.; DREGUS, M.; ENGEL, K.-H.; SCHWAB, W. Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Archives of biochemistry and biophysics*. Vol. 465(2) P. 417-429, 2007.

LANGE, B. M.; GHASSEMIAN, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*. Vol. 51. P. 925 – 948, 2002.

LEATHER, G. R.; EINHELLIG, F. A. Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*. V. 14. N. 10. P. 1821-1828, 1988.

LEE, S. Exploring the Biochemical and Evolutionary Diversity of Terpene Biosynthetic Enzymes in Plants. University of Kentucky Doctoral Dissertations, 2008.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nature Chemical Biology*, Vol. 3(7) P. 396-407, 2007.

MALACINSKI, G. M. *Fundamentos de Biologia Molecular*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário, otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. *Biotechnology, Ciência e desenvolvimento*. Ano 2(10) P. 24-28, 1999.

MARINHO, C., L., C.; GOMEZ, C., M. Decisões conflitivas na liberação dos transgênicos no Brasil. São Paulo em perspectiva. Vol. 18. N. 3. P. 96-102, 2004.

MCNELLIS, T. W.; VON ARNIM, A. G.; DENG, X. Overexpression of Arabidopsis COP1 results in partial suppression of light-mediated development: evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. *The plant cell*, Vol. 6 P. 1391-1400, 1994.

MEYEROWITZ, E.M. Arabidopsis, a useful weed. *CELL*. Vol. 56 P. 263-269, 1998.

MONQUERO, P. A. Plantas Transgênicas Resistentes aos Herbicidas: Situações e Perspectivas. *Bragantia*, Campinas, Vol. 64. N. 4. P. 517-531, 2005.

MOREIRA, L. S. D. Expressão gênica e voláteis induzidos pela herbivoria de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera Noctuidae) em milho, *Zea mays* L. (Poaceae). 2010. Tese (Mestrado em Entomologia) - Divisão de Biblioteca e Documentação – ESALQ/USP, 2010.

NAPOLI, C. LEMIEUX, C. JORGENSEN, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes *in trans*. *The Plant Cell*. Vol. 2. P. 279-289, 1990.

NCBI - <http://ncbi.nlm.nih.gov/About/model/index.html> 23/04/2012 14:30.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Ed. 33, 2004.

OHARA, K.; UJIHARA, T.; ENDO, T.; SATO, F.; YAZAKI, K. Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA. *Journal of experimental botany*, Vol. 54(393). P. 2635-42, 2003

OKADA, K.; SAITO, T.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; KAMIYA, Y. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant physiology*, Vol. 122(4). P. 1045-1056, 2000.

OLIVEIRA, P. A utilização de *Arabidopsis thaliana* no ensino. *Brotéria Genética*. Vol. XX (XCV). P. 5-62, 1999.

OLIVEIRA, S. C. C.; FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Efeito Alelopático das Folhas de *Solanum Lycocarpum* A. ST. Hil. (Solanaceae) na Germinação e Crescimento de *Seasamum indicum* L. (Pedialiceae) Sob Diferentes Temperaturas. *Acta Botânica Brasília*. V. 18. N. 3. P. 401-406, 2004.

PANDELÓ, J. D. Clonagem e caracterização parcial de dois genes de enzimas da via de terpenos em *Lippia Alba*. 2009. Tese (Mestrado em Imunologia / Genética e Biotecnologia) - Universidade Federal de Juíz de Fora, Juíz de Fora, 2009.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Escola superior de Agricultura “Luiz de Queros” – USP, 2004.

PFAFFL, M. W. A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. Vol. 29. N. 9, 2001.

PIERCE, B. Genetics: a conceptual approach. Freeman and Company, 3ª Edição, 2011.

RAO, A. Q.; IRFAN, M.; SALEEM, Z.; NASIR, I. A.; RIAZUDDINS.; HUSNAIN, T. Overexpression of the phytochrome B gene from *Arabidopsis thaliana* increase plant growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum*). Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. Vol. 12. N. 4. P. 326 – 334, 2011.

Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, 2010.

SAMBROOK, J.;RUSSEL, D. W. Molecular cloning. A Laboratory manual. 3ª Edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SAPIR-MIR, M.; METT, A.; BELAUSOV, E.; TAL-MESHULAM, S.; FRYDMAN, A.; GIDONI, D.; EYAL, W. Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. Plant Physiology. Vol 148(3) P. 1219-28, 2008.

SARTORETTO, L., M.; SALDANHA, C., W.; CORDER, M., P., M. Transformação Genética: Estratégias e Aplicações para o Melhoramento Genético de Espécies Florestais. Ciência Rural, Santa Maria. V. 38. N.3 P. 861-871, 2008.

SCHRADER, K. K.; ANDOLFI, A.; CANTRELL, C. L.; CIMMINO, A.; DUKE, S. O.; OSBRINK, W.; WEDGE, D. E.; EVIDENTE, A. A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management. Chemistry and Biodiversity. Vol. 7, 2010.

SCOLNIK, P. A.; BARTLEY, G. E. Nucleotide Sequence of an *Arabidopsis* cDNA for Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase. Plant Physiology. Vol. 104 P. 1469-1470, 1994.

SILVA, G. B.; MARTIM, L.; SILVA, C. L.; YOUNG, M., C., M.; LADEIRA, A. M. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, São Paulo, SP, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E., P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. FARMACOGNISIA da planta ao medicamento. 5ª ed. Ampl. Porto Alegre / Florianópolis: Editoras: UFRGS e UFSC, 2003.

STROPA, K. C. Enumeração Celular Pela Quantificação Absoluta por PCR em Tempo Real de Culturas de Bradirrizóbios. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jabotocabal. Dissertação de Mestrado, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3. Ed. São Paulo: Artmed. 2004.

TELES, R., M. Caracterização Química, Avaliação Térmica e Atividade Larvicida Frente ao *Aedes aegypti* do Óleo Essencial da Espécie Vegetal *Aniba duckei*

Kostermans. Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2009.

THOLL, D.; LEE, S. Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis Thaliana*. American Society of plant Biologists. The Arabidopsis Book, 2011. doi:10.1199/tab.0143

WEIGEL, D.; GLAZEBROOK, J. ARABIDOPSIS A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York, 2002.

WESTON, L. A. Utilization of Allelopathy for Weed Management in Agroecosystems. Agronomy Journal. Vol. 88. N. 6. P.860-870, 1996.

YAMAGUCHI, S.; SAITO, T.; ABE, H.; YAMANE, H.; MUROFUSHI, N.; KAMIYA, Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme ent-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.). The Plant journal : for cell and molecular biology. P. 203-213, 1996.

ZWENGER, S.; BASU, C.; STATES, U. (2007). Case report : In Silico Analysis of Terpene Synthase genes in *Arabidopsis thaliana*. Chemosphere. P. 203-211, 2007.

ZHU, X.; SUZUKI, K.; SAITO, T.; OKADA, K.; TANAKA, K.; NAKAGAWA, T.; MATSUDA, H.; KAWAMUKAI, M. Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. Plant Molecular Biology. N. 3 P. 331-341. DOI: 10.1023/A:1005898805326, 1997.

ZHU, X.; SUZUKI, K.; SAITO, T.; OKADA, K.; TANAKA, K.; NAKAGAWA, T.; MATSUDA, H.; KAWAMUKAI, M. Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl Pyrophosphatase Synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. Plant cell Physiology. Vol. 38. N. 3. P. 357-361, 1997

