



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica**

**Estudo da associação dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*
em *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) a
Compostos alelopáticos**

Débora Almeida Alcantara da Silva

**Brasília – DF
2016**

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**Estudo da associação dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* em
Arabidopsis thaliana L. (Brassicaceae) a
Compostos alelopáticos**

Débora Almeida Alcantara da Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF
2016

*Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)*

ASI586 Almeida Alcantara da Silva, Débora
e Estudo da associação dos genes GGR, GGPPS2 e
GGPPS6 em *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) a
compostos alelopáticos / Débora Almeida Alcantara da
Silva; orientador Luiz Alfredo Rodrigues Pereira. --
Brasília, 2016.
84 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Botânica) --
Universidade de Brasília, 2016.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Geranyl geranyl
difosfato. 3. Alelopatia. 4. Fitoquímicos. 5.
Terpenos. I. Alfredo Rodrigues Pereira, Luiz,
orient. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, Débora Almeida Alcantara da. Estudo da associação dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* em *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) a compostos alelopáticos. Brasília: Departamento de Botânica. Universidade de Brasília, 2016. 84f. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Almeida Alcantara da Silva

Estudo da associação dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* em
Arabidopsis thaliana L. (Brassicaceae) a
Compostos alelopáticos

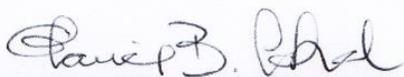
Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em Botânica, do Instituto
de Ciências Biológicas, da Universidade
de Brasília, como parte dos requisitos à
obtenção do título de Mestre.



Prof. Dr. Luiz Alfredo Rodrigues Pereira (Orientador)
Universidade de Brasília (UnB)



Dr. Francisco José Lima Aragão
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) /
Universidade de Brasília (UnB)



Dra. Glauca Barbosa Cabral
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Dra. Michelle de Souza Fayad André (Suplente)
Universidade de Brasília (UnB)

Brasília, 28 de abril de 2016.

A Deus.

Aos meus pais José Carlos e Raquel.

Com amor e imensa gratidão, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes anos, muitas pessoas estiveram envolvidas neste projeto, as quais gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a **Deus**, que me sustentou até aqui. Por ter colocado pessoas essenciais em meu caminho e pela oportunidade de ingressar no Mestrado, onde vivenciei experiências que marcaram e mudaram a minha vida de forma positiva.

Aos meus amados pais **José Carlos** e **Raquel**, os meus infinitos agradecimentos. Agradeço por tudo o que me ensinaram, pelo incentivo nos meus estudos e por compreenderem minha ausência em certos momentos. Agradeço por todo o tipo de suporte que me deram e por serem tão presentes e essenciais na minha vida.

Ao meu irmão **André**, pela amizade e por me fazer dar risada até nos meus dias mais tensos, o que fez com que os dias se tornassem mais leves.

A cada um dos meus familiares (família Alcantara e família Almeida Bueno), pelo carinho e pela torcida. Em especial, pelo legado e pelo exemplo de vida dos meus avós **Anísio**, **Elvina** (*in memorian*), **José** (*in memorian*) e **Elísia**.

A todos os amigos e àqueles que torceram para que o trabalho fosse bem-sucedido. Especialmente aos amigos **Isaac**, **Shirley**, **Micla** e **Leisa**, por todo o apoio e pelos momentos agradáveis de comunhão em nossos “cafezinhos”.

Aos colegas com os quais convivi no Mestrado. Em especial à amiga **Darislene Ericeira**, pela ajuda no dia-a-dia e nas disciplinas que cursamos; agradeço pelos ensinamentos de vida e pela sua contagiante alegria, que fez com que esta caminhada fosse mais divertida e animada. Às amigas **Renata Cristina** e **Jéssica Melo**, pela disponibilidade em ajudar, pelos conselhos e pelos momentos de descontração fora do laboratório. À querida **Juliane Laner**, que iniciou os estudos desta linha de pesquisa no grupo e sempre foi muito atenciosa em me auxiliar com as dúvidas que surgiram.

Ao meu orientador, Dr. **Luiz Pereira**, por ter me dado a oportunidade de trabalhar nesta área que aprendi a respeitar mais ainda. Agradeço pela confiança e pela paciência.

À Dra. **Michelle Fayad**, que no começo foi a pessoa que me ensinou os procedimentos básicos da rotina de um laboratório e permaneceu me orientando pacientemente ao longo destes anos. Agradeço pelo seu acompanhamento, pela sua dedicação e preocupação em cada momento.

Aos estagiários que ajudaram em alguma etapa do trabalho. Especialmente, aos estagiários **João Pedro e Flaviani**, pelo companheirismo, pela dedicação e responsabilidade que demonstraram para com os trabalhos que desenvolvemos juntos.

Ao professor Dr. **Francisco Aragão**, que disponibilizou o uso do Laboratório de Engenharia Genética (L.E.G.) – Embrapa CENARGEN. Agradeço pela confiança, pelo excelente acompanhamento e por todos os ensinamentos, os quais guardarei com muito apreço.

Na pessoa da Dra. **Gláucia Cabral** e na pessoa da Dra. **Elsa Nogueira**, agradeço a todos os pesquisadores e colaboradores do L.E.G., que foram muito receptivos e prestativos durante o tempo que trabalhei lá. Agradeço, especialmente, à **Thaís Cipriano**, uma ótima pessoa e uma ótima profissional a qual admiro muito. Obrigada por seu acompanhamento no L.E.G., sempre disposta e educada, me concedendo toda a assistência e apoio para a condução dos experimentos e ajudar no que fosse preciso.

Ao Dr. **Gabriel Alves**, que de maneira tão gentil e excelente me ajudou muito nos experimentos de PCR em Tempo Real, desde o planejamento até a conclusão da técnica. Agradeço por ter cedido partes do seu tempo para me ensinar cada passo com paciência. Sou grata pelo seu ótimo exemplo de profissional, de caráter e de conduta, características admiráveis que lembrarei sempre com muito respeito.

Ao professor Dr. **Fernando Araripe**, por ter colaborado com os materiais fundamentais para PCR em Tempo Real.

Ao doutorando **André Bertran**, pelas dicas e instruções que me concedeu para trabalhar com RNA. À Dra. **Anelise Orílio**, por sua grande ajuda para a realização de algumas técnicas utilizadas pelo nosso grupo. Agradeço pela sua paciência e por todas as vezes que nos auxiliou durante esses anos.

À **Lílian Hasegawa**, por terem cedido o espaço para cultivo das plantas.

Aos prestativos técnicos **Fábio Nakamura** e **Jéssika Vieira**, por sempre terem ajudado quando surgia alguma necessidade ou dúvida no laboratório. Agradeço pelos ensinamentos e por transmitirem alegria e dedicação no trabalho.

Aos professores do departamento de Botânica e àqueles do departamento de Biologia Celular que contribuíram por meio das aulas, orientações, cedendo uso de equipamentos, materiais e de outras formas.

Ao **CNPq**, pela bolsa de Mestrado concedida. Agradeço a estes e a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida.

RESUMO

A planta modelo, *Arabidopsis thaliana*, produz uma diversidade de metabólitos secundários. Dentre os metabólitos secundários, os terpenos formam a maior e mais diversa classe. Os terpenos estão envolvidos em várias funções fisiológicas importantes nos vegetais, entre as quais têm sido associados a compostos alelopáticos. O geranyl geranyl difosfato (GGPP) é o precursor para a biossíntese de terpenos. Estudos anteriores estabeleceram uma associação entre plantas transgênicas que supostamente superexpressavam os genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*, envolvidos na síntese de terpenos, com efeitos alelopáticos. Para contribuir na elucidação desta associação, o primeiro capítulo deste estudo teve como objetivo estudar o efeito do silenciamento dos genes *GGR*, *GGPS2* e *GGPPS6* em *A. thaliana* e resposta alelopática de *Arabidopsis*. Assim, vetores de RNAi para *GGR*, *GGPS2* e *GGPPS6* foram sintetizados e transferidos para *Agrobacterium tumefaciens* e em seguida as plantas de *Arabidopsis* foram transformadas para o silenciamento desses genes. As plântulas transformadas foram selecionadas em meio MS contendo glufosinato de amônio como composto seletivo. Foi possível selecionar três plantas da geração T1 e duas plantas da geração T2, transformadas com o vetor de silenciamento para o gene *GGPPS2*. Entretanto, as plantas transformadas não sobreviveram. Além disso, não foi possível selecionar plantas com vetores de silenciamento para os genes *GGR* e *GGPPS6*. No segundo capítulo, o objetivo foi avaliar a expressão relativa do gene *GGR* em plantas selvagens e transgênicas de *Arabidopsis thaliana* que que supostamente superexpressam esse gene. Adicionalmente, objetivou-se verificar a associação entre os níveis de expressão de *GGR* e respostas alelopáticas em *A. thaliana*. Assim, uma série de PCR em Tempo Real, utilizando sondas TaqMan® para *GGR* tendo como genes de referência: *ACT2* e *RAD23C*. Ao contrário do esperado, as plantas selvagens expressaram mais o gene *GGR* que todas as linhagens que supostamente superexpressavam esse gene. Esse dado pode indicar que um processo de cossupressão de *GGR* pode ter ocorrido nas plantas transgênicas. Estudos prévios sobre as respostas alelopáticas mostram que extratos foliares de plantas transgênicas de *Arabidopsis* com *GGR* têm efeito alelopático mais acentuados que os extratos de plantas selvagens. Assim, pelo menos para o gene *GGR*, quanto menor o seu nível de expressão maior a resposta alelopática da planta. Uma possível explicação para isso se baseia no fato de que a menor expressão de *GGR* disponibilizaria mais substrato para a enzima GGPP sintase e consequentemente, maior produção de terpenos. Outra possibilidade é que a redução da expressão de *GGR* poderia induzir outras vias metabólicas que aumentam a produção de compostos alelopáticos.

Palavras-chave: *Arabidopsis thaliana*, Geranyl geranyl difosfato, Alelopatia, Fitoquímicos, Terpenos.

ABSTRACT

The model plant, *Arabidopsis thaliana*, produces a variety of secondary metabolites. Among the secondary metabolites, terpenes are the largest and most diverse class. Terpenes are involved in several important physiological functions in plants, among which they have been associated with allelopathic compounds. Geranyl geranyl diphosphate (GGPP) is the precursor for the biosynthesis of terpenes. Previous studies established a positive association between transgenic plants that supposedly overexpressed *GGR*, *GGPPS2* and *GGPPS6* genes, which are involved in terpene synthesis, and allelopathic response. Therefore, the first part of this research focused on investigating the effect *GGR*, *GGPPS2* and *GGPPS6* silencing on *A. thaliana* allelopathic response. Furthermore, *GGR*, *GGPPS2* and *GGPPS6* RNAi vectors were transferred to *Agrobacterium tumefaciens* and then used to transform *Arabidopsis* plants with the purpose of silencing these genes. Transformed *Arabidopsis* seedlings were selected on MS medium containing glufosinate-ammonium as selective compound. It was possible to select three T1 generation plants and two T2 generation plants containing the silencing vector for *GGPPS2* silencing. However, the transformed plants did not survive. Moreover, it was not possible to select plants containing *GGR* and *GGPPS6* silencing vectors. In the second chapter, the objective was to evaluate the expression of *GGR* gene in wild type and transgenic *A. thaliana* transgenic plants that supposedly overexpressed this gene. In addition, the association between *GGR* expression levels and allelopathic responses in *A. thaliana* was investigated. Thus, a series of RT-PCR using TaqMan probes for *GGR* and the following reference genes: *RAD23C* and *ACT2* were performed. Contrary to expectations, wild plants expressed the *GGR* gene at higher level than all lineages of *GGR* transformed plants. This data indicates that a cosuppression of *GGR* may have taken place in the transgenic plants. Previous studies on allelopathic responses of *Arabidopsis* showed that leaf extracts of *GGR* transformed *Arabidopsis* plants have stronger allelopathic effect than those from wild type plants. Thus, at least with respect to *GGR* gene, the lower the level of *GGR* expression the higher the allelopathic response of *Arabidopsis* plant. One possible explanation for this phenomenon is based on the fact that a low expression of *GGR* would provide more substrate for GGPP synthase, which consequently would increase terpene production. Another possibility links the reduction of *GGR* expression with the induction of other metabolic pathways associated with an increase of allelopathic compound production.

Key-words: *Arabidopsis thaliana*, Geranylgeranyl diphosphate, Allelopathy, Phytochemicals, Terpenes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema dos compartimentos celulares e vias envolvidas na biossíntese de isoprenos em *Arabidopsis thaliana*. Fonte: Adaptado de Beck et al., 2013. 28
- Figura 2.** Desenho esquemático do vetor *pGGRRNAi*. O vetor é controlado pelo promotor 35SCaMV. Possui seqüências do gene *GGR* de aproximadamente 400 pb na orientação senso e antisenso, separadas pelo íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*. Os genes *bar* e *nptI* conferem resistência ao glufosinato de amônio e à canamicina, respectivamente. 38
- Figura 3.** Desenho esquemático do vetor *pGGPPS2RNAi*. O vetor é controlado pelo promotor 35SCaMV. Possui seqüências do gene *GGPPS2* de aproximadamente 400 pb na orientação senso e antisenso, separadas pelo íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*. Os genes *bar* e *nptI* conferem resistência ao glufosinato de amônio e à canamicina, respectivamente. 39
- Figura 4.** Desenho esquemático do vetor *pGGPPS6RNAi*. O vetor é controlado pelo promotor 35SCaMV. Possui seqüências do gene *GGPPS6* de aproximadamente 400 pb na orientação senso e antisenso, separadas pelo íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*. Os genes *bar* e *nptI* conferem resistência ao glufosinato de amônio e à canamicina, respectivamente. 39
- Figura 5.** Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGR* para confecção do vetor. 40
- Figura 6.** Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGPPS2* para confecção do vetor. 40
- Figura 7.** Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGPPS6* para confecção do vetor. 41
- Figura 8.** Esquema das principais etapas de transformação de *Arabidopsis thaliana* com *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação. 45
- Figura 9.** Detecção da proteína PAT nos pré-inóculos de *Agrobacterium tumefaciens* eletroporadas com os vetores de silenciamento dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*. 47
- Figura 10.** Gel de agarose a 1%. A colônia *GGR*col.10 (coluna 10) apresentou produto de amplificação de DNA genômico com os primers *bar 534* e *bar 90*. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) DNA das bactérias da colônia número 10; (3) Controle positivo – plasmídeo *pGGRRNAi*; (4) Controle negativo – água (NTC - No template control). 48

Figura 11. Placas com meio MS suplementado com o marcador seletivo glufosinato de amônio (10 mg.L⁻¹) e os antibióticos Timentin® (150 mg.L⁻¹) e cefotaxima (300 mg.L⁻¹). A placa da esquerda refere-se à seleção de plantas transformadas com o vetor de silenciamento de *GGPPS2* e possui duas plântulas bem desenvolvidas (destaque setas). A placa da direita (controle) apresenta plântulas muito pequenas e sem clorofila. 49

Figura 12. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR das plantas das linhagens D41, D42 e D43 (primeira geração) com o vetor *pGGPPS2RNAi*. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) Controle negativo – água (NTC - No template control); (3) Controle negativo – DNA de planta selvagem; (4) DNA da planta D41; (5) DNA da planta D42; (6) DNA da planta D43; (7) Controle positivo – plasmídeo *pGGPPS2RNAi*..... 50

Figura 13. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR das plantas das linhagens D42E e D43A (segunda geração) com o vetor *pGGPPS2RNAi*. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) Controle negativo – água (NTC - No template control); (3) Controle negativo – DNA de planta selvagem; (4) DNA da planta D42E; (5) DNA da planta D43A; (6) Controle positivo – plasmídeo *pGGPPS2RNAi*..... 50

Figura 14. Gel desnaturante de agarose 1,2% corado com brometo de etídio para checagem da integridade de RNA. As bandas das subunidades de RNA ribossomal 28S (superiores) e 18S (inferiores) mostram a integridade do RNA. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) 4GB 1; (2) 4GB 2; (3) 4GB 9; (4) 4GC 1; (5) 4GC 2; (6) 4GC 3; (7) 4GM1; (8) 4GM 2; (9) 4GM 6. 63

Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos de PCR com o primer *actin2* demonstram que as amostras de cDNA estão livres de contaminação por DNA genômico. As amostras de cDNA apresentam amplicons de 131 pb enquanto a amostra de DNA (controle positivo) apresenta 209 pb. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™); (2) Controle negativo (NTC) - água; (3) Selvagem (WT) 1; (4) Selvagem (WT) 2; (5) Selvagem (WT) 3; (6) 4GA 2; (7) 4GA 5; (8) 4GA 8; (9) 4GB 1; (10) 4GB 2; (11) 4GB 9; (12) 4GC 1; (13) 4GC 2; (14) 4GC 3; (15) 4GM 1; (16) 4GM 2; (17) 4GM 6; (18) Controle positivo – DNA de *Arabidopsis thaliana* selvagem..... 64

Figura 16. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com produtos de PCR com os primers que amplificam o gene *EF1α*. As amostras de cDNA apresentam amplicons de 404 pb. A amostra de DNA selvagem (controle positivo) não amplificou. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™); (2) Controle negativo (NTC) - água; (3) Selvagem (WT) 1; (4) Selvagem (WT) 2; (5) Selvagem (WT) 3; (6) 4GA 2; (7) 4GA 5; (8) 4GA 8; (9) 4GB 1; (10) 4GB 9; (11) 4GC 1; (12) 4GC 2; (13) 4GC 3; (14) 4GM 1; (15) 4GM 2; (16) 4GM 6; (17) Controle positivo – DNA de *Arabidopsis thaliana* selvagem; (18) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™). 65

Figura 17. Expressão relativa do gene *GGR* em relação ao gene de referência *ACT8* (AT1G49240) em amostras foliares de *Arabidopsis thaliana* com cinco semanas de idade. 66

Figura 18. Expressão relativa do gene *GGR* em relação ao gene de referência *RAD23C* (At3G02540) em amostras foliares de *Arabidopsis thaliana* com cinco semanas de idade. 66

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação do código dos genes GGPP sintase de acordo com o TAIR e seus respectivos sinônimos relatados por Beck et al. (2013), Okada et al (2000) e Zhu et al. (1997 a; 1997 b). No presente trabalho, os genes estudados (*GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*) são mencionados segundo a nomenclatura de Okada et al. (2000) e estão destacados em negrito..... 29
- Tabela 2.** Porcentagem de inibição de extratos aquosos de folhas de plantas selvagens (WT) e plantas da primeira geração transformada para superexpressão do gene *GGR* (linhagens 4GA, 4GB, 4GC e 4GM) sobre sementes de gergelim (*Sesamum indicum*). Fonte: TOLEDO, 2014. 32
- Tabela 3.** Sequência dos primers usados nas reações de PCR para confirmação da integração do vetor nas bactérias eletroporadas e nas plantas submetidas ao mergulho floral (*floral dip*). 43
- Tabela 4.** Sequência dos primers utilizados para checar a ausência de DNA genômico nas amostras de cDNA utilizadas em PCR em Tempo Real. 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT2 – Gene actina 2 de *Arabidopsis thaliana* (At3G18780)

ACT8 – Gene actina 8 de *Arabidopsis thaliana* (At1G49240)

bar – Gene que codifica a proteína PAT e confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio.

C_T – Ciclo limiar (*Threshold Cycle*)

DEPC - Dietilpirocarbonato

DMAPP – Dimetilalil difosfato

dsRNA – RNA fita dupla (*double-stranded RNA*)

FPP - Farnesil difosfato

gDNA – DNA genômico

GA – Glufosinato de amônio (herbicida)

GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (*Gas chromatography-mass spectrometry*)

GPP - Geranil difosfato

GGPP – Geranil geranil difosfato

GGPPS – Geranil geranil difosfato sintase

GGPPS2 – Gene geranil geranil difosfato sintase 2 (At2g23800)

GGPPS6 – Gene geranil geranil difosfato sintase 6 (At1g49530)

GGR – Geranil geranil redutase

IPP – Isopentenil difosfato

LB – Luria-Bertani

MEP – 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

MES – Ácido 2-morfolino-etano-sulfônico

MGB - Ligante do sulco menor (*Minor Groove Binder*)

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – Micro RNA

MS – Murashige & Skoog

MVA – Ácido mevalônico

NTC – Controle negativo (*No Template Control*)

OD600 – Densidade óptica a 600 nanômetros

PAT – Fosfinotricina acetil-transferase

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia de polimerase (*Polymerase chain reaction*)

ppm – partes por milhão

RAD23C – Gene *RAD23C* receptor de ubiquitina de *Arabidopsis thaliana* (At3G02540)

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex*)

RNAi – RNA interferente

rpm – rotações por minuto

RT-PCR – PCR com transcrição reversa

RTq-PCR – PCR quantitativo em tempo real (*Real time quantitative PCR*)

SGDH – Silenciamento gênico dependente de homologia

SGPT – Silenciamento gênico pós-transcricional

SGT – Silenciamento gênico transcricional

snRNA – Pequeno RNA nuclear (*Small nuclear RNA*)

snoRNA – Pequeno RNA nucleolar (*Small nucleolar RNA*)

sRNA – Pequeno RNA (*Small RNA*)

siRNA – Pequeno RNA de interferência (*Small interfering RNA*)

TAIR - The *Arabidopsis* Information Resource

TPS - Terpeno sintase

UNG - *Uracil-N-glycosylase*

UV - Ultravioleta

WT – Linhagem Selvagem (*Wild Type*)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ix
AGRADECIMENTOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxi
1. INTRODUÇÃO GERAL	25
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
1.2. Metabólitos secundários e Terpenoides	26
1.3. Geranil geranil difosfato	28
CAPÍTULO I:	31
Transformação Genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. (Brassicaceae) via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para Silenciamento dos Genes <i>GGR</i>, <i>GGPPS2</i> e <i>GGPPS6</i> por RNA de interferência	31
1. INTRODUÇÃO	31
1.1. Alelopatia.....	31
1.2. Silenciamento gênico e RNA interferente	33
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1. Material vegetal	37
3.2. Vetores para silenciamento gênico	38
3.3. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com os vetores <i>pGGRRNAi</i> , <i>pGGPPS2RNAi</i> e <i>pGGPPS6 RNAi</i>	41
3.4. Preparo de pré-inóculos e confirmação da transgenia das colônias obtidas	42
3.5. Transformação de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
3.6. Seleção e confirmação de plantas transformadas geneticamente	45

4. RESULTADOS	47
4.1. Confirmação da transformação genética de colônias bacterianas.....	47
4.2. Seleção de plantas geneticamente modificadas	48
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	51
CAPÍTULO II:	53
Expressão Gênica por PCR em Tempo Real de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. (Brassicaceae) Superexpressando <i>GGR</i> e sua Associação com Respostas Alelopáticas	53
1 INTRODUÇÃO	53
1.1 PCR em Tempo Real	53
2. OBJETIVOS	55
2.1. OBJETIVO GERAL	55
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3. MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1. Material vegetal	56
3.2. RNA Total.....	57
3.2.1 Extração de RNA.....	57
3.2.2. Checagem da Integridade de RNA total.....	58
3.2.3. Tratamento com DNase e Quantificação do RNA total.....	59
3.3. Síntese de cDNA.....	59
3.4. Verificação de contaminação de RNA mensageiro com DNA genômico.....	60
3.5. PCR em Tempo Real	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Integridade das amostras utilizadas para PCR em Tempo Real	63
4.2. PCR em Tempo Real	65
5. DISCUSSÃO	68
5.1. Amostras de cDNA e genes de referência utilizados em PCR em Tempo Real.....	68
5.2. Análise de expressão relativa do gene <i>GGR</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
5.3. Expressão do gene <i>GGR</i> e Alelopatia.....	71
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana é uma planta herbácea pertencente à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Brassicales e família Brassicaceae. Fora do contexto taxonômico, esta planta foi descrita pela primeira vez por Alexander Braun, em 1873, onde verificou uma planta “mutante” em meio a um campo de plantas selvagens nas proximidades de Berlim. Possivelmente, tal modificação ocorrera no gene *AGAMOUS*, cujo fenótipo mutante resulta em flores acopladas no interior de outras flores e ausência de estames e carpelos (YANOFSKY et al., 1990; MEYEROWITZ, 2001). A sequência do genoma de *Arabidopsis* foi publicada no ano 2000, sendo a primeira planta a ter seu genoma completamente sequenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

A aceitação generalizada de *A. thaliana* como planta modelo ocorreu na década de 1980, em decorrência de sua utilidade em experiências genéticas. Considera-se como "organismo modelo" uma espécie extensivamente estudada com a finalidade de se entender fenômenos biológicos específicos, para que as descobertas facilitem o entendimento de fenômenos similares em outros organismos (DELATORRE & SILVA, 2008). Dentre as vantagens de se utilizar *A. thaliana* em estudos moleculares se devem em grande parte às seguintes características dessa planta: porte pequeno, o que permite o seu crescimento em espaço reduzido, rápida reprodução sexual, autogamia, ciclo de vida curto e alta produção de sementes. Além disso, uma característica importante para que *Arabidopsis* fosse considerada uma espécie modelo é sua possibilidade de ser transformada geneticamente por *Agrobacterium tumefaciens* (DELATORRE & SILVA, 2008; KOORNNEEF & MEINKE, 2010).

1.2. Metabólitos secundários e Terpenoides

Metabólitos secundários, também conhecidos como produtos secundários ou produtos naturais, são compostos orgânicos sintetizados por plantas, que não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal, contudo, podem atribuir aos indivíduos que os produzem vantagens adaptativas a determinadas condições ambientais. Os metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie ou grupo de espécies, enquanto os metabólitos primários ocorrem em todo o reino vegetal essenciais para a sobrevivência da espécie (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A *Arabidopsis* produz uma boa diversidade de metabólitos secundários tais como antocianinas, flavonoides, ésteres, glicosinolatos, terpenoides, camalexinas e outros derivados do triptofano (KLIEBENSTEIN, 2004).

Dentre os metabólitos secundários, a classe dos terpenos (ou terpenoides) é a maior e mais diversa. Estes compostos estão envolvidos na ação contra patógenos, contra herbívoros, na polinização, como hormônios vegetais (giberelinas) e na competição entre plantas vizinhas (THOLL & LEE, 2011a). O terpeno cineol, por exemplo, é um composto volátil e possui toxicidade se ingerido por herbívoros. Um estudo com as espécies de marsupiais *Wallabia bicolor* e *Trichosurus vulpecula* demonstrou que a introdução de cineol na dieta dos animais, diminuiu tanto a ingestão quanto o esforço forrageiro dos mesmos em relação aos alimentos que possuíam maior concentração do composto (BEDOYA-PÉREZ et al., 2014).

O termo terpeno é genérico para todos os componentes sintetizados a partir de precursores do isopreno (MATHEWS et al., 2000). A obtenção dos terpenos ocorre pela fusão repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos (isopreno ou isoprenóides), em um arranjo "cabeça-cauda". Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos que apresentam, sendo que um isopreno possui cinco átomos de carbono. Assim, existem os monoterpenos (possuem 10 carbonos, dois isoprenos), os sesquiterpenos (15

carbonos, três isoprenos), os diterpenos (20 carbonos, quatro isoprenos), os triterpenos (30 carbonos, seis isoprenos), os tetraterpenos (40 carbonos, oito isoprenos) e os politerpenos, que contêm mais do que oito unidades de isopreno (CROTEAU et al., 2000).

As formações das unidades isoprenóides ocorrem a partir de duas rotas independentes: rota do ácido mevalônico (MVA) e rota 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (CARRETERO-PAULET et al., 2002). As plantas sintetizam isoprenóides por ambas as vias citadas, porém, em compartimentos distintos: a via MEP sintetiza isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) nos plastídios e a via MVA produz IPP no citosol (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN & BORONAT, 2002).

O MVA é o primeiro precursor específico na biossíntese dos terpenoides e após uma série de reações, forma geranyl difosfato (GPP - 10 Carbonos), farnesil difosfato (FPP - 15 Carbonos) e geranyl-geranyl difosfato (GGPP - 20 Carbonos) (VALDUGA et al., 2009). A síntese do MVA ocorre pela condensação de três moléculas de acetil-CoA por meio da via acetoacetil-CoA e 3-hidroxi-3-glutaril-CoA (HMG-CoA), que posteriormente produzirá o IPP (WANKE et al., 2001).

Todos os terpenoides são derivados da condensação entre IPP e DMAPP, conforme mostrado na Figura 1.

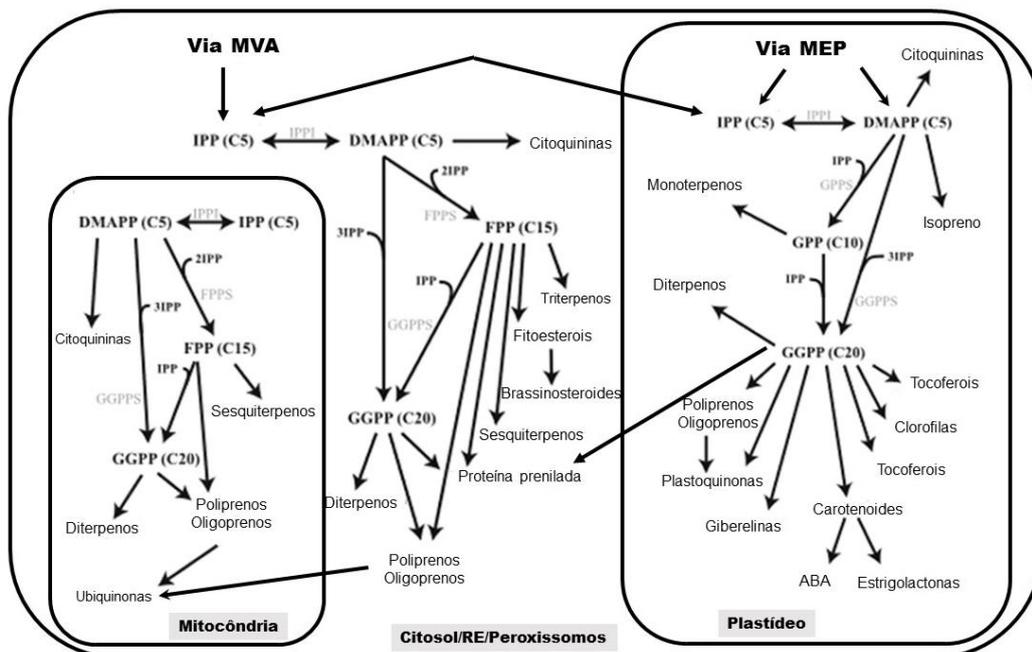


Figura 1. Esquema dos compartimentos celulares e vias envolvidas na biossíntese de isoprenos em *Arabidopsis thaliana*. Fonte: Adaptado de Beck et al., 2013.

1.3. Geranyl geranyl difosfato

Muitos produtos importantes para o crescimento vegetal e para respostas a mudanças ambientais são derivados do isopreno (OKADA et al., 2000). O geranyl geranyl difosfato (*GGPP*), um dos derivados de isoprenos, é formado pela condensação entre IPP e DMAPP (GIULIANO, 2014).

O *GGPP* é um precursor para a biossíntese de componentes necessários ao crescimento vegetal, como giberelinas, carotenóides, clorofila, isoprenóides, quinonas e proteínas relacionadas ao geranyl geranyl. Os carotenóides, por exemplo, são sintetizados pela condensação de duas moléculas de *GGPP* (OKADA et al., 2000). Estes são considerados a primeira linha de defesa presente no citoplasma das plantas, onde exercem funções relacionadas à proteção contra processos foto-oxidativos potencialmente prejudiciais, como a toxicidade de oxigênio, através da captura de moléculas nocivas sob a luminosidade (TAKANO et al., 2005; RAMEL et al., 2012).

Além de ser precursor de carotenoides, o *GGPP* também é precursor do ácido abscísico, de tocoferóis, da cadeia fitol da clorofila, de plastoquinonas e do ácido giberélico (CHAO et al., 2014). Todos componentes de grande importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em *Arabidopsis*, foram identificados 12 genes da família GGPP sintase (*GGPPS*) (BECK et al., 2013). Desses, seis genes já haviam sido reportados anteriormente por Okada et al. (2000) e Zhu et al. (1997a; 1997 b), tratam-se dos mesmos genes, porém, com nomenclaturas diferentes (Tabela 1). No contexto deste trabalho, a citação dos genes em estudo (*GGR* - At4g38640; *GGPPS2* - At2g23800 e *GGPPS6* - At1g49530) segue a denominação feita por Okada et al. (2000). Quanto à menção dos demais genes, foram utilizados os nomes registrados no banco de dados TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).

Tabela 1. Relação do código dos genes GGPP sintase de acordo com o TAIR e seus respectivos sinônimos relatados por Beck et al. (2013), Okada et al (2000) e Zhu et al. (1997 a; 1997 b). No presente trabalho, os genes estudados (*GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*) são mencionados segundo a nomenclatura de Okada et al. (2000) e estão destacados em negrito.

TAIR	BECK et al. (2013)	OKADA et al. (2000)	Zhu et al. (1997a)	Zhu et al. (1997b)
At1g49530	<i>GGPPS1</i>	<i>GGPPS6</i>	----	<i>GGPPS6</i>
At2g18620	<i>GGPPS2</i>	----	----	----
At2g18640	<i>GGPPS3</i>	<i>GGPPS4</i>	----	----
At2g23800	<i>GGPPS4</i>	<i>GGPPS2</i>	<i>GGPPS5</i>	----
At3g14510	<i>GGPPS5</i>	----	----	----
At3g14540	<i>GGPPS6</i>	----	----	----
At3g14550	<i>GGPPS7</i>	<i>GGPPS3</i>	----	----
At3g20160	<i>GGPPS8</i>	----	----	----
At3g29430	<i>GGPPS9</i>	----	----	----
At3g32040	<i>GGPPS10</i>	----	----	----
At4g36810	<i>GGPPS11</i>	<i>GGPPS1</i>	----	----
At4g38640	<i>GGPPS12</i>	<i>GGR</i>	----	----

As enzimas de *GGPP* sintase possuem localizações supostas (putativas) a diferentes compartimentos celulares, tais como mitocôndrias, retículos endoplasmáticos ou plastídios. O gene *GGPPS6* (At1g49530) foi localizado em mitocôndrias; os genes At2g18640 e At2g23800 (*GGPPS2*) em retículos endoplasmáticos. Já os genes At3g14540, At3g14550, At3g20160, At3g29430, At4g36810 foram localizados em plastídios (BECK et al., 2013).

Estudos de expressão mostram que At1g49530 e At4g36810 são genes constitutivos, expressos em todos os órgãos e em quase todos os tecidos da planta; já o gene At3g14510 é considerado um pseudogene (BECK et al., 2013). Algumas das enzimas *GGPP* sintases em *Arabidopsis* podem ter funções fisiológicas associadas à biossíntese de terpenos (OKADA et al., 2000). As plantas acumuladoras de terpenos frequentemente apresentam estruturas de células secretoras específicas e exalam odores. Estas características não são evidentes em *Arabidopsis*, porém, mesmo assim há produção destes compostos na planta (THOLL & LEE, 2011a).

Com respeito ao gene At4g38640 (*GGR*), localizado em plastídeos, sua expressão é considerada constitutiva em raízes, folhas, caules e flores de *A. thaliana*. Apesar de possuir a menor similaridade dentre os 12 genes da família *GGPPS* em *A. thaliana*, o *GGR* pode ser ativo como heterodímero em junção com At4g36810, resultando em uma enzima *GGPPS* envolvida na síntese de monoterpenos (WANG & DIXON, 2009; BECK et al., 2013; CHEN, FAN & WANG, 2015). Alguns experimentos *in vitro* demonstraram que por si mesmo, *GGR* não é uma enzima *GGPPS* ativa. Assim, este gene foi reclassificado como membro da classe de genes prenil difosfato sintase, dentro da subfamília de proteínas denominada *GPP* sintase II de “subunidade pequena” (SSU-II, do inglês *GPP synthase small subunit*).

CAPÍTULO I:

Transformação Genética de *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) via *Agrobacterium tumefaciens* para Silenciamento dos Genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* por RNA de interferência

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alelopatia

Como já mencionado, os terpenos estão envolvidos em processos de interações planta-planta. Esta característica os define como compostos alelopáticos. A alelopatia, no contexto vegetal, se caracteriza pela produção e liberação de substâncias químicas por plantas que afetam, quer seja de forma positiva ou negativa, o crescimento e desenvolvimento de outras plantas (TUR et al., 2012). Esta ação de aleloquímicos sobre outras plantas tem sido considerada como uma alternativa potencial ao uso de defensivos agrícolas, como nematicidas, inseticidas e herbicidas (FERREIRA & AQUILA, 2000).

Uma vez que terpenos estão presentes em *Arabidopsis*, e que suas enzimas GGPP sintases estão associadas à biossíntese destes compostos, no presente trabalho pretendeu-se investigar a relação dos terpenos aos processos de alelopatia por meio de bioensaios, bem como estudar as funções fisiológicas de três genes GGPP sintase - *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* (nomenclatura de Okada et al., 2000) - na espécie vegetal em questão.

Em trabalho anterior, Toledo (2014) realizou bioensaios com sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.), submetendo-as aos efeitos de extratos aquosos de cinco linhagens (4GA, 4GB, 4GC, 4GD e 4GM) de *Arabidopsis* que superexpressavam os genes supracitados. O efeito dessas plantas sobre o crescimento de gergelim foi comparado com aquele de plantas de *Arabidopsis* não transformadas (selvagens). Como resultado, verificou-se que o extrato

foliar de plantas transformadas inibiram tanto o crescimento de raízes quanto o crescimento do caule de plântulas de gergelim de forma mais intensa que o respectivo controle. Por exemplo, o extrato foliar de uma das linhagens transformadas de *Arabidopsis* (4GA, superexpressando o gene *GGR*), diluído a 1,5%, inibiu o crescimento de plântulas de gergelim em torno de 64% (raiz) e 42% (caule) quando comparado com os extratos foliares de plantas selvagens (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de inibição de extratos aquosos de folhas de plantas selvagens (WT) e plantas da primeira geração transformada para superexpressão do gene *GGR* (linhagens 4GA, 4GB, 4GC e 4GM) sobre sementes de gergelim (*Sesamum indicum*). Fonte: TOLEDO, 2014.

	Inibição do crescimento (%)					
	Diluição do extrato	Extrato WT em relação ao controle negativo (água)	Extrato 4GA em relação ao extrato WT	Extrato 4GB em relação ao extrato WT	Extrato 4GC em relação ao extrato WT	Extrato 4GM em relação ao extrato WT
Inibição da parte radicular	3%	-----	-----	-----	48	64
	1,5%	70	64	88	84	82
	0,75%	57	76	90	5,5	60
Inibição da parte aérea	3%	-----	-----	-----	21	72
	1,5%	26	42	65	66	70
	0,75%	38	61	69	40	26

Além desta inibição, foi verificado que o tempo de germinação das sementes de gergelim submetidas aos extratos foliares de *Arabidopsis* foi maior, de 30 a 60 horas, do que aquelas tratadas com água destilada, que foi de 25,6 horas (TOLEDO, 2014).

Os terpenos exercem várias funções fisiológicas importantes, entre as quais têm sido associados com compostos alelopáticos (TOLEDO, 2014). As plantas produtoras de compostos alelopáticos apresentam potencialidades de aplicações, dentre estas, o controle de ervas daninhas, com menos custos e menores prejuízos ao meio ambiente (ALBUQUERQUE et al., 2011).

Concomitantemente, esta pesquisa pode resultar em produtos biotecnológicos, como por exemplo, plantas geneticamente modificadas cujo potencial alelopático seja mais efetivo no controle de plantas daninhas (ALBUQUERQUE et al., 2011).

Este estudo faz parte de um programa de pesquisa que visa entender melhor a relação entre a síntese de terpenos e compostos alelopáticos. Toledo (2014) estabeleceu uma associação entre a superexpressão de genes associados à síntese de terpenos e efeitos alelopáticos em plantas de *Arabidopsis*. Em função disso, é crucial estudar a função dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*, envolvidos na síntese de terpenos. O silenciamento desses genes pode dar uma contribuição muito importante na elucidação da associação entre terpenos e alelopatia.

1.2. Silenciamento gênico e RNA interferente

O gene é a unidade do DNA que possui informação para a síntese específica de uma cadeia polipeptídica ou um RNA funcional (LODISH et al., 2007). A expressão de muitos genes está sujeita à regulação, dessa forma, estes genes são ativados somente quando a célula necessita de seus produtos. Por outro lado, existem genes expressos durante todo o tempo, e por causa disso são conhecidos como constitutivos ou genes “*housekeeping*” (BROWN, 2003).

A expressão de um gene abrange uma série de etapas, sendo a transcrição e a tradução as duas principais etapas desse processo. Durante a transcrição, a sequência de nucleotídeos de uma das fitas de DNA, chamada de senso, de um determinado gene serve como molde. A enzima RNA polimerase II se liga à região do DNA (denominada de promotor) e catalisa a formação de uma molécula de mRNA complementar à sequência original. A tradução é a segunda maior etapa da expressão gênica, onde a sequência do mRNA é decodificada para a síntese da cadeia de aminoácidos, formadora de proteínas (CLANCY & BROWN, 2008).

Foram evidenciados em estudos ao longo dos anos, grande quantidade de RNAs que eram transcritos mas não codificavam proteínas. Posteriormente, tal ocorrência pôde ser explicada pelos processos de *splicing* de mRNA, genes de RNA funcionando como maquinaria de tradução (tais como rRNA, tRNA) e pela presença de pequenos RNAs reguladores da tradução de mRNA (RINN & CHANG, 2012). A expressão gênica pode ser interrompida por vários processos em qualquer uma das suas etapas. No âmbito do processo de transcrição um dos processos que pode interromper a manifestação do produto de um gene são os processos baseado na similaridade entre sequências gênicas.

Em plantas, o silenciamento gênico pode ocorrer tanto no nível transcricional quanto pós-transcricional (ELMAYAN et al., 1998). Nestas interações, o silenciamento dependente de homologia (SGDH), também denominado de co-supressão pode ocorrer de ser pós-transcricional (SGPT) ou silenciamento gênico transcricional (SGT). No SGPT ocorre degradação de RNAs homólogos e conseqüentemente não ocorre a tradução. Já no processo de SGT, a transcrição é bloqueada pela indução de um RNA antisense (VENDRUSCOLO, 2003).

No presente trabalho, o foco será dado no silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT). Esse tipo de fenômeno é de ocorrência natural e foi primeiramente observado nos anos de 1990 em vários organismos como plantas, fungos, animais e ciliados (VAUCHERET et al., 2001). Esse processo foi denominado de RNAi (RNA interferente).

Durante o processo de RNAi ocorre uma interferência no processo de transcrição mediada por fragmentos de RNA dupla fita (dsRNA – *double-stranded RNA*). Em plantas, RNAi foi primeiramente descrito em petúnia por Napoli et al. (1990). Neste estudo, os autores pretendiam superexpressar um gene envolvido na produção de pigmentos, através da introdução do gene da enzima chalcona sintase (CHS) para produção de uma coloração roxa intensa. Contudo, de forma surpreendente, a introdução desse gene resultou em um bloqueio

total da biossíntese de antocianina, e as plantas transformadas apresentaram flores brancas ao invés da coloração pretendida. Tal fenômeno, denominado de "co-supressão", também foi observado em outros organismos, mas na época, o mecanismo envolvido no silenciamento gênico ainda não havia sido esclarecido (FRANÇA et al., 2010). Posteriormente, descobriu-se que se tratava de SGPT, também conhecido como RNAi (RNA interferente).

Em 1998, Andrew Fire e Craig Mello descreveram em *Caenorhabditis elegans* o mecanismo básico de RNAi, o que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2006. Nesta investigação do fenômeno de interferência por RNA, observou-se que a injeção de dupla fita de RNA em nematelmintos *C. elegans*, causava diminuição ou eliminação dos transcritos de RNAs mensageiros endógenos. Os indivíduos de *C. elegans* que receberam o dsRNAs apresentaram fenótipos muito específicos, relacionados aos genes correspondentes. Assim, eles manifestaram deficiências em estruturas musculares e mobilidade prejudicada.

O evento de RNAi é de ocorrência natural nas células de organismos eucarióticos. De forma geral, o RNAi tem sido relacionado à proteção dos organismos, incluindo animais e plantas, contra vírus, elementos transponíveis (transposons), além de estarem envolvidos em processos de regulação gênica (VAUCHERET et al., 2001; SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA et al., 2003).

RNAi é disparado pela introdução de uma molécula de RNA dupla fita em uma célula. Em seguida, uma enzima conhecida como Dicer, que é uma endoribonuclease, corta a dupla fita de RNA em pequenos fragmentos (21 a 23 nucleotídeos), denominados de *small interfering RNAs* (siRNAs). Uma das fitas desses fragmentos siRNAs é incorporada em um complexo enzimático denominado de RISC (*RNA-induced silencing complex*), que por sua vez, se liga ao mRNA complementar à sequência dos siRNAs. Em seguida, o complexo RISC cliva os transcritos complementares, resultando na interrupção do processo tradução (GLICK et al., 2009).

Os sRNAs (*small RNAs*) abrangem diversas classes de RNAs não-codificantes, incluindo os *small interfering RNAs* (siRNAs), os *micro RNAs* (miRNAs), os *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) e os *small nuclear RNAs* (snRNAs), cada um deles com suas propriedades e funções (BUCKINGHAM, 2003).

Existem três vias naturais de silenciamento de RNA em plantas: a via de silenciamento com siRNA citoplasmático, a de silenciamento de mRNAs endógenos por miRNAs e a via associada à metilação do DNA e supressão da transcrição (BAULCOMBE, 2004). Em mamíferos, nematódeos e moscas, RNAi pode ser induzido pela introdução direta de RNAs fita dupla. Já em plantas, RNAi geralmente é estabelecido através da transformação com um "*construct*" que produz dsRNAs via formação de *hairpin* (HIRAI & KODAMA, 2008).

Os vetores RNAi consistem de sequências marcadas e repetidas de maneira invertida sob o controle de um promotor forte. As sequências repetidas e invertidas são separadas por um fragmento espaçador. Após a transcrição, estas sequências formam uma estrutura de dupla fita de RNA (dsRNA), denominada "*stem*". Já o espaçador forma o "*loop*" (i.e., alça) do RNA *hairpin* (HIRAI & KODAMA, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do silenciamento dos genes de Geranyl geranyl sintase: *GGR* (At4g38640), *GGPS2* (At2g23800) e *GGPPS6* (At1g49530) em *A. thaliana*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar vetores de expressão de siRNAs para silenciamento dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6* em *Arabidopsis thaliana*;

- Obter linhagens de plantas geneticamente modificadas a partir da seleção de plântulas tolerantes ao herbicida glufosinato de amônio (GA);
- Caracterizar o fenótipo e os aspectos fisiológicos apresentados por plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas para supressão dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*;
- Estudar os efeitos do silenciamento destes genes através de bioensaios alelopáticos sobre sementes de gergelim.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As sementes de *A. thaliana* (ecótipo Columbia) foram cedidas pelo Laboratório de Reprodução Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). No Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – Departamento de Botânica (UnB), aproximadamente 10 sementes foram colocadas em cada pote contendo substrato (Tropstrato HT Hortaliças[®] ou Bioplant[®]) autoclavado, totalizando aproximadamente 21 potes. As bandejas com os potes foram cobertas com um filme plástico e colocadas no escuro a 4° C durante 48 h, para sincronizar a germinação.

Depois deste período, os potes foram transferidos para uma sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16 h de luz, a 22° C. As sementes germinaram de 2 a 3 dias após a transferência para a sala de crescimento. As primeiras inflorescências foram removidas logo após emergirem, a fim de induzir o desenvolvimento de mais inflorescências, por meio da quebra da dominância apical. As sementes obtidas a partir destas plantas foram armazenadas em tubos e colocados sob refrigeração a 4° C, para que fossem selecionadas e utilizadas em experimentos posteriores.

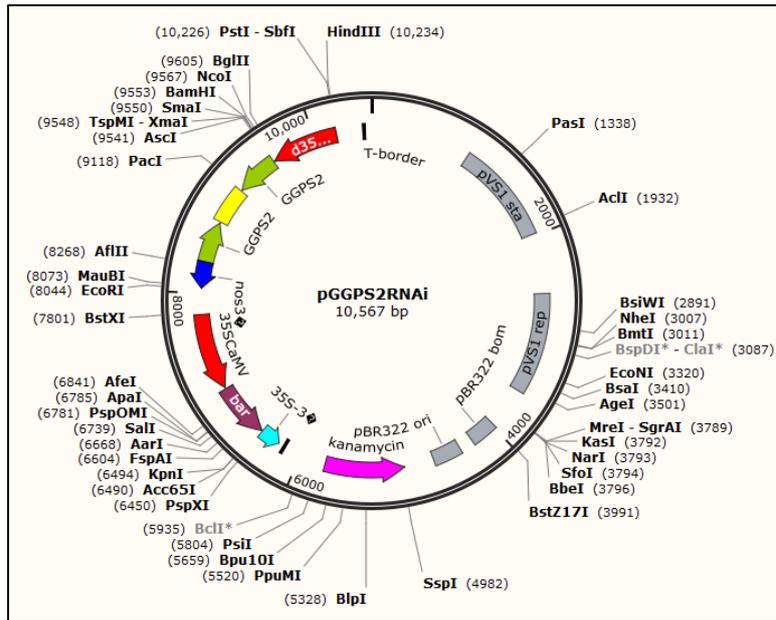


Figura 3. Desenho esquemático do vetor *pGGPS2RNAi*. O vetor é controlado pelo promotor 35S::CaMV. Possui seqüências do gene *GGPS2* de aproximadamente 400 pb na orientação senso e antisense, separadas pelo íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*. Os genes *bar* e *nptII* conferem resistência ao glufosinato de amônio e à canamicina, respectivamente.

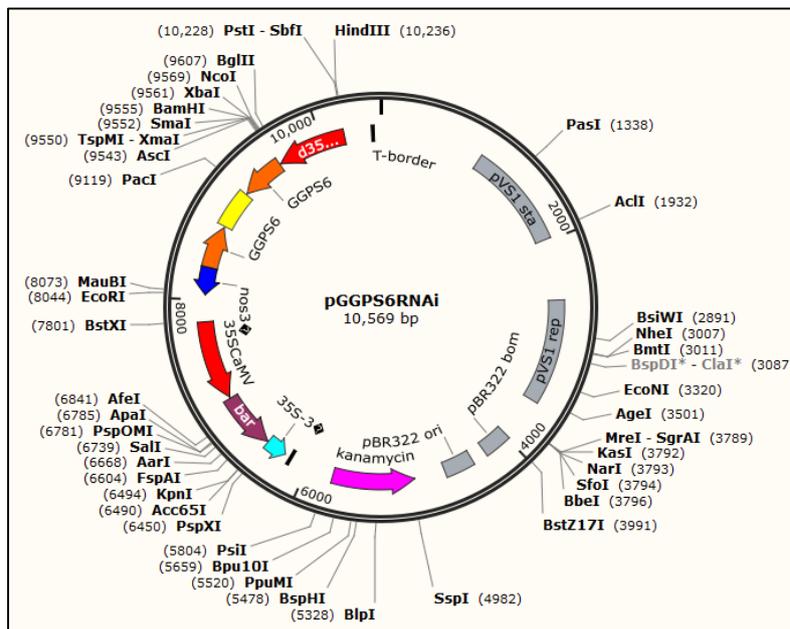


Figura 4. Desenho esquemático do vetor *pGGPS6RNAi*. O vetor é controlado pelo promotor 35S::CaMV. Possui seqüências do gene *GGPS6* de aproximadamente 400 pb na orientação senso e antisense, separadas pelo íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*. Os genes *bar* e *nptII* conferem resistência ao glufosinato de amônio e à canamicina, respectivamente.

Os vetores possuem como promotor o 35S, proveniente de RNA35S do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV - *Cauliflower mosaic virus*). Para cada um dos três vetores de silenciamento, uma sequência do gene a ser silenciado, de aproximadamente 400 pares de bases, está inserida tanto na orientação senso quanto na orientação antisenso. Entre as sequências senso e antisenso existe um íntron 3 do gene da malato sintase de *Nicotiana tabacum*.

Nos vetores estão inseridos os genes *bar* e *nptII*, que conferem resistência ao herbicida glufosinato de amônio (GA) e ao antibiótico canamicina, respectivamente. Utilizou-se o antibiótico canamicina como marcador seletivo para as bactérias e o GA para plantas. Os sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *HpaI*, *MfeI* e *AscI*. *PacI* foram adicionados nas terminações opostas das sequências gênicas para amplificação dos fragmentos senso e antisenso, respectivamente (Figuras 5-7).

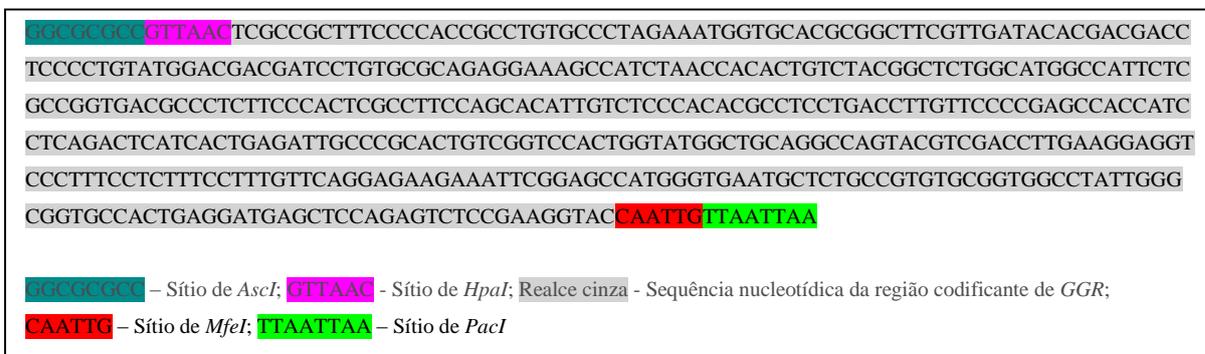


Figura 5. Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGR* para confecção do vetor.

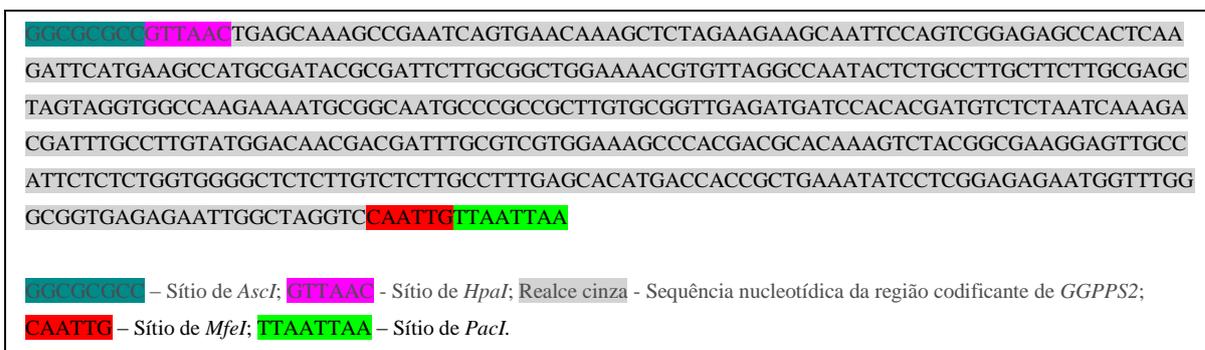


Figura 6. Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGPPS2* para confecção do vetor.

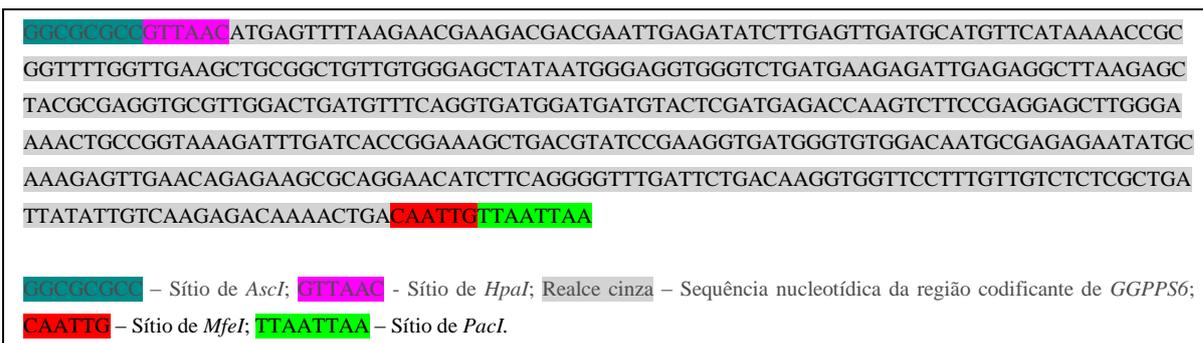


Figura 7. Sítios de restrição e fragmento escolhido a partir da região codificante de *GGPPS6* para confecção do vetor.

3.3. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com os vetores *pGGRRNAi*, *pGGPPS2RNAi* e *pGGPPS6 RNAi*

A transferência dos vetores dos genes *pGGRRNAi*, *pGGPPS2RNAi* e *pGGPPS6 RNAi* para *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada pelo método de eletroporação (WEIGEL & GLAZEBROOK, 2002). As células competentes utilizadas pertenciam à linhagem LBA4404.

Em tubos de microcentrífuga estéreis e devidamente identificados, 1 μL de cada vetor ($10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) foi adicionado a 40 μL do estoque de células competentes de *A. tumefaciens* desarmada. Após seus conteúdos serem delicadamente misturados, os tubos foram incubados no gelo por 2 min. Em seguida, as suspensões foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1 cm, previamente resfriadas no gelo. O pulso foi aplicado em eletroporador MicroPulser (Bio-Rad™). Em seguida, adicionou-se às suspensões 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) líquido (SAMBROOK & RUSSELL, 2006), suplementado com os antibióticos canamicina ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), espectinomicina ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e rifampicina ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Após a eletroporação, as suspensões bacterianas foram transferidas das cubetas para os tubos de microcentrífuga e colocados em incubadora a 28°C durante 4-6 h. Foram transferidos volumes que variaram de 100 μL , 200 μL e 500 μL de cada suspensão de células para a superfície de placas contendo meio LB sólido (1% de triptona, 0,5% de extrato de

levedura e 1% de cloreto de sódio; pH ajustado para 7.0 com NaOH; 1,6% de ágar; autoclavado a 120° C por 20 min.), suplementado com os antibióticos canamicina (100 mg.L⁻¹), espectinomicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹). As suspensões foram espalhadas nos meios de cultura com auxílio de alça de vidro esterilizada por imersão em álcool etílico e passagem pela chama. Depois que as suspensões secaram sob o meio LB, as placas foram vedadas e colocadas em incubadora a 28° C por 2-3 dias.

3.4. Preparo de pré-inóculos e confirmação da transgenia das colônias obtidas

As colônias obtidas após 2-3 dias foram selecionadas para o preparo de pré-inóculos. Para tanto, a ponta de um palito foi encostada na colônia e o mesmo fora deixado dentro de tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB líquido (SAMBROOK & RUSSELL, 2006) suplementado com 5 µL de canamicina (100 mg.L⁻¹), 5 µL de rifampicina (100 mg.L⁻¹) e 5 µL de espectinomicina (100 mg.L⁻¹). Os tubos foram mantidos em incubadora durante 48 h, a 28° C e 180 rpm. Após 48 h, armazenou-se os pré-inóculos em refrigerador.

Para a confirmação da transformação das colônias que cresceram, 400 µL de células bacterianas dos pré-inóculos foram colocados em tubos de microcentrífuga e centrifugados a 13.000 rpm por 30 s. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* adicionou-se 200 µL de tampão PBS 1X (0,14% de Na₂HPO₄, 0,024% de KH₂PO₄, 0,8% de NaCl e 0,02% de KCl; pH ajustado para 7,4; autoclavado por 20 min. à 120° C). Após a homogeneização do conteúdo dos tubos, as fitas foram colocadas em contato com os mesmos por cerca de 10 min., intervalo de tempo no qual pode-se verificar a coloração ou ausência de cor da linha teste da fita, o que indica a presença ou a ausência da proteína PAT, respectivamente (Método de imunocromatografia - Lateral Flow Strip Assay).

Além do teste por imunocromatografia, foram realizadas reações de PCR com as bactérias eletroporadas com o vetor de silenciamento do gene *GGR*. Para tanto, utilizou-se o

par de primers bar 534 e bar 90 (Tabela 3), que amplificam 448 pb. O programa utilizado no termociclador consistia em 35 ciclos de 5 min. a 95° C; 1 min. a 95° C; 1 min. a 55° C; 1 min. a 72° C, com extensão final de sete min. a 72° C e posterior manutenção de 4° C até ser retirado do termociclador e armazenado em freezer. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, 100 mL de tampão TBE 0,5X (TBE 5X: 54 g.L⁻¹ de Tris Base, 27,5 g.L⁻¹ de ácido bórico, 20 ml de EDTA 500 mM pH 8,0), a 80 V, corado com 3 µL de SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

Tabela 3. Sequência dos primers usados nas reações de PCR para confirmação da integração do vetor nas bactérias eletroporadas e nas plantas submetidas ao mergulho floral (*floral dip*).

Primer	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho do amplicon
bar 534	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC	448 pb
bar 90	GGTCTGCACCATCGTCAACC	

As linhagens de bactérias transformadas com os vetores de silenciamento dos genes foram armazenadas a -80° C, sob a forma de cultura “*stab*” (*GGR* - colônia 10 e *GGPPS6* – col. 01) e em glicerol 40% (*GGR* – col. 10, *GGPPS2* – col. 02 e *GGPPS6* – col. 01).

Para a conservação por “*stab*”, primeiramente foram preparados dois tubos de microcentrífuga contendo 300 µL de meio LB sólido. Com auxílio de palitos de madeira, as bactérias das duas linhagens supracitadas foram transferidas para os respectivos tubos Falcon contendo 3 mL de meio LB líquido em cada um, onde cresceram a 28° C e 128 rpm durante 48 h. Após este período, os pré-inóculos foram tocados com alça de transferência esterilizada, e em seguida, espetou-se a alça no meio LB sólido (com os antibióticos) contido no tubo de microcentrífuga. Os tubos foram fechados, identificados com o nome da linhagem e armazenados a 4° C.

Quanto ao estoque em glicerol, as linhagens bacterianas (*GGR* – col. 10, *GGPPS2* – col. 02 e *GGPPS6* – col. 01) foram cultivadas em meio LB líquido até atingirem a fase

exponencial de crescimento, onde OD600 = 0,5 a 1,0 (BRASILEIRO & CARNEIRO, 1998). Transferiu-se 750 µL de cada suspensão bacteriana para um tubo de microcentrífuga, contendo 750 µL de glicerol 40% estéril. Os tubos foram fechados e a suspensão e o glicerol foram homogeneizados em agitador tipo “vórtex”, obtendo uma concentração final de glicerol 20% (v/v). Os tubos foram identificados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados em -80° C.

3.5. Transformação de *Arabidopsis thaliana*

As plantas foram cultivadas como descrito no subitem 3.1. Logo que emergiram, cerca de 3-4 semanas após a germinação, as primeiras inflorescências foram removidas, para induzir o desenvolvimento de mais inflorescências. Aproximadamente seis dias após esta clivagem, as plantas, com botões florais fechados e sem pétalas aparentes, foram submetidas ao método de transformação denominado mergulho floral (*floral dip*) (CLOUGH & BENT, 1998), descrito por Brasileiro, Cabral & Silva (2015).

Para tanto, um dia antes da transformação das plantas, escolheu-se uma pré-cultura de células bacterianas de cada uma das três construções gênicas, cuja transformação havia sido confirmada (subitem 3.4). Em três frascos Erlenmeyer, cada um contendo 200 mL de meio LB líquido autoclavado, suplementados com os antibióticos canamicina (100 mg.L⁻¹), espectinomomicina (100 mg.L⁻¹) e rifampicina (100 mg.L⁻¹) foram adicionados 1.500 µL das pré-culturas correspondentes aos vetores *pGRRNAi*, *pGGPPS2RNAi* e *pGGPPS6 RNAi*. Os frascos foram vedados e colocados em incubadora a 28° C, 200 rpm de agitação durante 24 h.

Após 24 h, realizaram-se leituras da densidade óptica (OD600) em espectrofotômetro, a fim de que as culturas utilizadas no mergulho floral estivessem com OD600 entre 0,8 e 2,0. As culturas de *A. tumefaciens* foram centrifugadas em tubos de centrífuga a 4.000 rpm durante 23 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspenso em 250 mL de

solução de infiltração (0,22% sais MS; 0,05% MES; 0,02% Silwet L-77; 5% sacarose; pH ajustado para 5,7 e autoclavado).

As inflorescências foram mergulhadas na solução supracitada, com *Agrobacterium* contendo o vetor de interesse (Figura 8). Os potes com as plantas mergulhadas (aproximadamente 7 plantas para cada construção gênica) foram devidamente identificados e deixados na posição horizontal durante 24 h, sob uma bandeja coberta com plástico filme. No dia seguinte, os potes foram colocados na posição vertical e as plantas foram regadas normalmente ao longo dos dias de cultivo até o aparecimento de sílicas. As sementes dos indivíduos foram coletadas e armazenadas em tubos refrigerados a 4° C, para uso posterior.

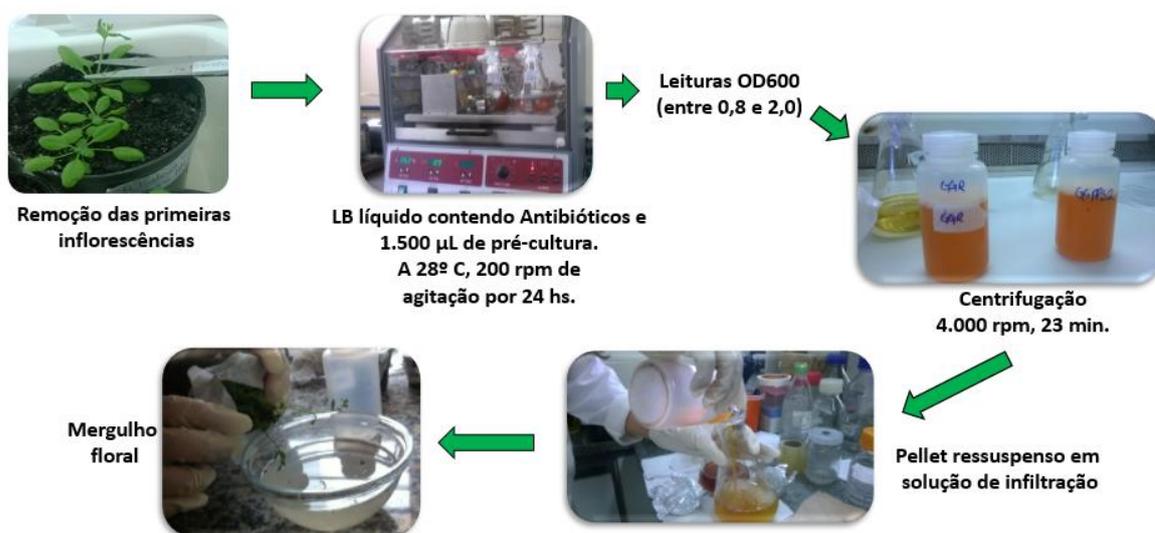


Figura 8. Esquema das principais etapas de transformação de *Arabidopsis thaliana* com *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação.

3.6. Seleção e confirmação de plantas transformadas geneticamente

Como mencionado, o herbicida glufosinato de amônio (GA) foi usado como marcador seletivo para as plantas geneticamente modificadas. A resistência ao GA é conferida pelo gene bacteriano de resistência ao bialafos (*BAR*), que codifica a enzima fosfinotricina acetiltransferase (PAT) (MARTINEZ et al., 2005) presente na construção do transgene. Ao passar

aproximadamente três semanas após o mergulho floral, as sementes foram colhidas e armazenadas em 4° C para posterior seleção.

A seleção foi realizada em placas contendo meio MS sólido (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado (DAS & JOSHI, 2011) (4,3 g.L⁻¹ de sais MS; 10 g.L⁻¹ de sacarose; 0,5 g.L⁻¹ de MES; 8 g.L⁻¹ de ágar). Após ser autoclavado, o meio foi suplementado com GA (10 g.L⁻¹) e as placas foram vedadas até serem usadas para plaqueamento das sementes.

Para a esterilização, uma parte das sementes de cada linhagem foi colocada em tubos de microcentrífuga rotulados. Trabalhando em capela de fluxo esterilizada com etanol, adicionou-se 1 mL de solução de lavagem (70% de etanol + 0,05% de Triton X-100) às sementes, seguindo-se uma agitação manual dos tubos por 5 min. A solução de lavagem foi retirada com pipeta e substituída por 1 mL de etanol 95%, que após 5 min. foi retirado e novamente substituído por 1 mL de solução de lavagem.

As sementes, juntamente com a solução de lavagem, foram retiradas com pipeta e colocadas sob filtros de papel esterilizados, onde permaneceram até que os filtros secassem. Depois de secas, as sementes foram polvilhadas sob as placas contendo o meio MS sólido. As placas foram vedadas e colocadas em sala de crescimento. Após aproximadamente 14 dias, analisou-se as plantas visualmente, a fim de verificar a diferenciação entre as plantas transformadas (mais robustas, com folhas mais verdes e raízes mais longas), das não-transformadas, que possuem folhas amareladas e raízes curtas.

Estas plantas (geração T₁), possivelmente transformadas, foram transferidas para recipientes com solo, crescidas em câmara de crescimento até que gerassem sementes (eventos da geração T₂). A confirmação da transgenia por reações de PCR foi realizada com amostras foliares de plantas das gerações T₁ e T₂. Foram usados os mesmos pares de primers (bar 90; bar 534) e ciclos citados no tópico 5.4.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação da transformação genética de colônias bacterianas

A confirmação da transformação genética das bactérias eletroporadas foi realizada pelo método de imunocromatografia com tiras, conforme mencionado no subitem 3.4. A detecção da proteína PAT nos pré-inóculos preparados, foi verificada em um pré-inóculo de colônias bacterianas transformadas com o vetor de silenciamento do gene *GGR* (denominado de *GGR*col.10), em duas colônias para o *GGPPS2* (*GGPPS2*col.01 e *GGPPS2*col.02) e em dez colônias transformadas com o vetor de silenciamento de *GGPPS6* (*GGPPS6* col.01 a *GGPPS6* col.10) (Figura 9).

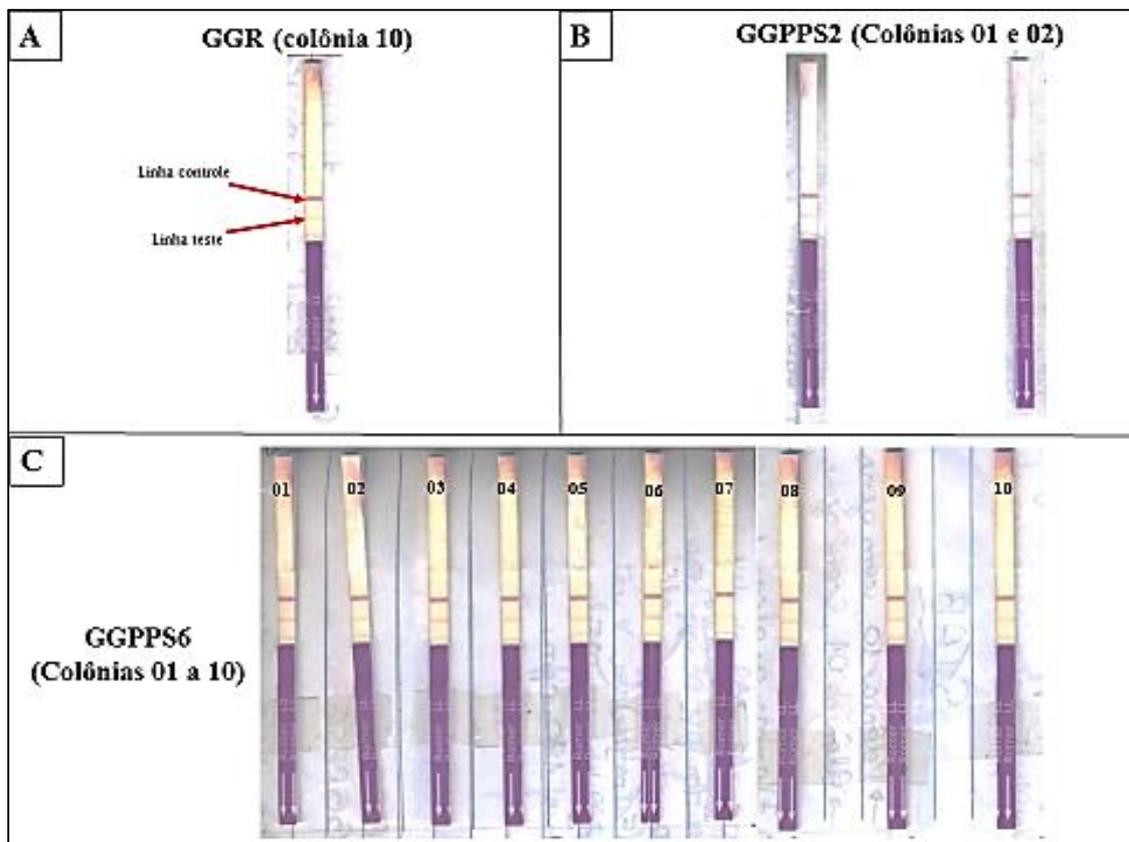


Figura 9. Detecção da proteína PAT nos pré-inóculos de *Agrobacterium tumefaciens* eletroporadas com os vetores de silenciamento dos genes *GGR*, *GGPPS2* e *GGPPS6*.

Os pré-inóculos cuja transformação genética foi confirmada foram armazenados sob a forma de cultura “stab” e glicerol 40% em freezer -80° C (subitem 3.4). A técnica de PCR foi utilizada apenas com o material genético das colônias de bactérias eletroporadas com o vetor *pGGRRNAi*, para silenciamento do gene *GGR*. O par de primers utilizados nas reações de PCR foi bar 534 e bar 90, que amplifica 448 pares de bases (Tabela 3). Conforme visualizado em gel de agarose 1%, a presença da banda correspondente à colônia 10 (*GGRcol.10*) sugere a introdução do vetor à mesma (Figura 10). Os resultados corroboraram tanto pelo teste de imunocromatografia quanto pela eletroforese realizada com a colônia em questão.

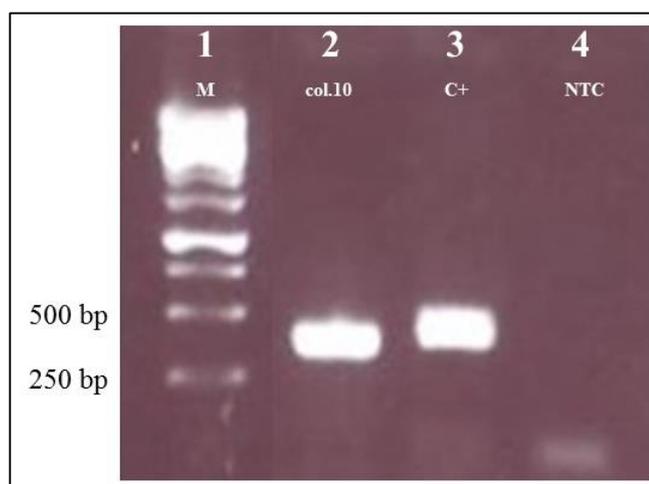


Figura 10. Gel de agarose a 1%. A colônia *GGRcol.10* (coluna 10) apresentou produto de amplificação de DNA genômico com os primers bar 534 e bar 90. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) DNA das bactérias da colônia número 10; (3) Controle positivo – plasmídeo *pGGRRNAi*; (4) Controle negativo – água (NTC - No template control).

4.2. Seleção de plantas geneticamente modificadas

Conforme descrito no subitem 3.5, as plantas foram submetidas ao mergulho floral com meios de infiltração contendo o vetor *pGGRRNAi*, *pGGPPS2RNAi* e *pGGPPS6RNAi*, separadamente. Estas plantas geraram sementes (T_0), que foram armazenadas e selecionadas. Inicialmente, a concentração de GA utilizada no meio MS era de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Porém, essa

concentração de herbicida não foi suficiente para a seleção de plantas transformadas, visto que tanto o controle quanto as sementes advindas do tratamento de mergulho floral germinaram. Assim, para selecionar eficientemente plântulas transformadas, a concentração de GA foi aumentada para 10 mg.L⁻¹.

A concentração de 10 mg.L⁻¹ de GA no meio seletivo foi mais eficaz no processo de seleção, visto que, a diferença entre o tratamento e o controle (plantas selvagens) foi evidente (Figura 11). Para prevenir a contaminação bacteriana nos meios de cultura também foi adicionado aos meios seletivos os antibióticos Timentin[®] (150 mg.L⁻¹) e Cefotaxima (300 mg.L⁻¹).

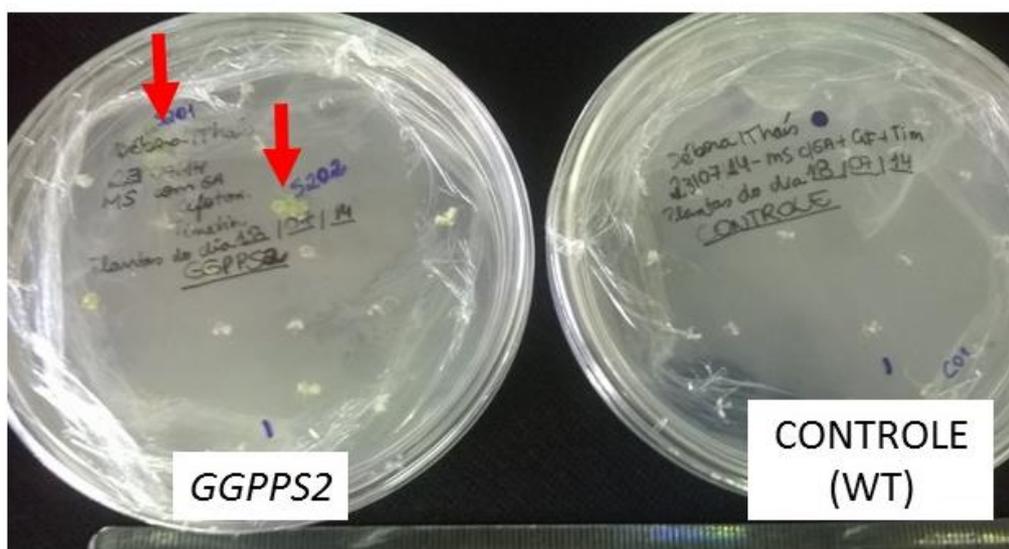


Figura 11. Placas com meio MS suplementado com o marcador seletivo glufosinato de amônio (10 mg.L⁻¹) e os antibióticos Timentin[®] (150 mg.L⁻¹) e cefotaxima (300 mg.L⁻¹). A placa da esquerda refere-se à seleção de plantas transformadas com o vetor de silenciamento de *GGPPS2* e possui duas plântulas bem desenvolvidas (destaques setas). A placa da direita (controle) apresenta plântulas muito pequenas e sem clorofila.

Após o plaqueamento em meio seletivo de sementes provenientes das plantas submetidas ao mergulho floral, algumas plântulas foram identificadas possivelmente como transformadas (geração T₁). Em seguida estas plântulas foram transferidas para o substrato de terra vegetal (Bioplant[®]). A confirmação da transformação foi feita via PCR em três plantas para a construção de silenciamento do gene *GGPPS2*, as quais foram denominadas de “D41”, “D42” e “D43” (Figura 12).

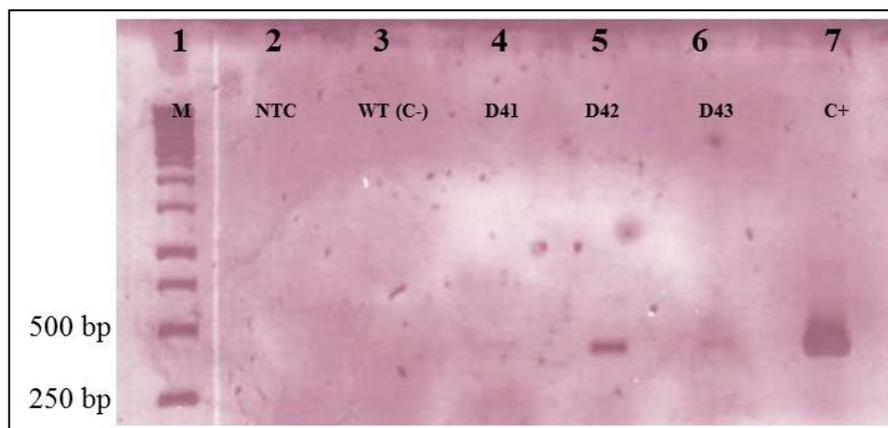


Figura 12. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR das plantas das linhagens D41, D42 e D43 (primeira geração) com o vetor *pGGPPS2RNAi*. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) Controle negativo – água (NTC - *No template control*); (3) Controle negativo – DNA de planta selvagem; (4) DNA da planta D41; (5) DNA da planta D42; (6) DNA da planta D43; (7) Controle positivo – plasmídeo *pGGPPS2RNAi*.

As sementes dessas três plantas foram armazenadas em refrigerador, para que fossem novamente colocadas em meio seletivo, a fim de se obter a geração T₂. Por meio de PCR, confirmou-se a integração da construção ao genoma de uma planta da linhagem D42 e uma planta da linhagem D43 denominadas de “D42E” e “D43A”, respectivamente (Figura 13). As duas plantas se apresentaram saudáveis até certo ponto, contudo, não sobreviveram até gerarem sementes.

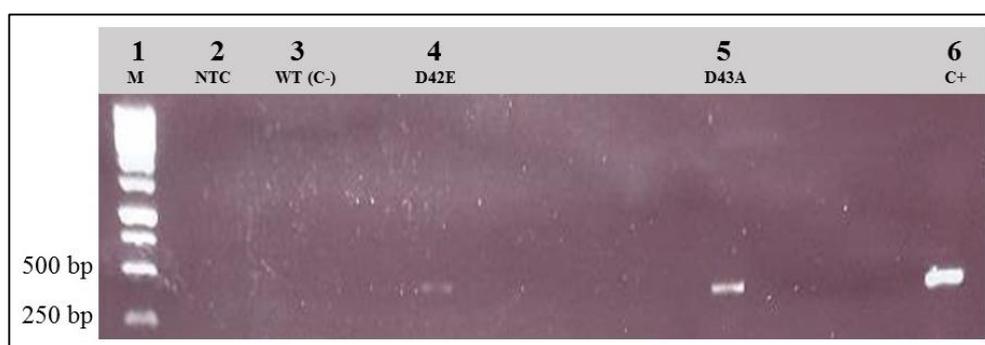


Figura 13. Gel de agarose a 1%. Produto de PCR das plantas das linhagens D42E e D43A (segunda geração) com o vetor *pGGPPS2RNAi*. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador 1kb Ladder; (2) Controle negativo – água (NTC - *No template control*); (3) Controle negativo – DNA de planta selvagem; (4) DNA da planta D42E; (5) DNA da planta D43A; (6) Controle positivo – plasmídeo *pGGPPS2RNAi*.

5. DISCUSSÃO

Dentre os métodos de transformação genética de *Arabidopsis thaliana*, dois dos principais podem ser destacados: o método de transformação de raiz, que utiliza cultura de tecidos (*in vitro*) (VALVEKENS et al., 1988) e o método *floral dip*, realizado *in planta* (CLOUGH & BENT, 1998). O método *floral dip*, descrito por Clough e Bent (1998) é extensamente utilizado e é considerado um protocolo simples, rápido e com baixos custos. Entretanto, sua frequência de transformação na geração T1, varia de 0,1% a 3% (GHEDIRA et al., 2013).

Este método, que consiste na imersão das inflorescências de *Arabidopsis thaliana* em suspensão contendo *Agrobacterium* e um surfactante, é suficiente para a geração de sementes transformadas (HARRISON et al., 2006). Porém, existem algumas dificuldades no processo de seleção das plantas, tais como a distinção entre plântulas transformadas de plântulas não transformadas; a contaminação fúngica do meio; e o atraso no branqueamento das plântulas não transformadas, seja pela contaminação por fungos, que esgotam o antibiótico do meio ou pela aglomeração de plântulas na placa, que faz com que o contato entre as raízes e o antibiótico seja minimizado. A metodologia de seleção proposta por Harrison et al (2006) leva um período de três dias, ao contrário de outras seleções que levam cerca de sete a dez dias, esta redução no tempo também visa evitar os problemas de seleção já mencionados.

6. CONCLUSÕES

Constatou-se que o sistema de transformação via *Agrobacterium tumefaciens* foi eficiente para a transformação de plantas com o vetor de silenciamento do gene *GGPPS2*. Para esta construção gênica, foi possível selecionar três plantas na geração T1 e duas plantas na geração T2. Para dar prosseguimento aos estudos da progênie, seria necessário selecionar mais plantas tanto da geração T1 quanto da geração T2.

Quanto ao silenciamento dos genes *GGR* e *GGPPS6*, o ideal é que tanto a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* quanto de *Arabidopsis thaliana* fossem repetidas. O silenciamento dos genes por meio de RNA interferente poderia dar mais suporte à associação destes genes nos processos de alelopatia e outros processos envolvidos.

CAPÍTULO II:

Expressão Gênica por PCR em Tempo Real de *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) Superexpressando *GGR* e sua Associação com Respostas Alelopáticas

1 INTRODUÇÃO

1.1 PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real consiste na coleta contínua dos sinais de fluorescência de uma ou mais reações de PCR ao longo de um intervalo de ciclos (SHIPLEY, 2007). Os dados são armazenados enquanto o processo de PCR ocorre, combinando a amplificação e a detecção em uma única etapa (WONG & MEDRANO, 2005).

Uma das principais vantagens da RTq-PCR em relação à PCR convencional está em sua acurácia e alta sensibilidade na determinação da concentração inicial de DNA (NAVARRO et al., 2015). Os instrumentos de RTq-PCR consistem, basicamente, em termocicladores acoplados a uma fonte de luz (uma lâmpada, *laser* ou *LED*), um sistema detector de fluorescência e um software, que exhibe os dados de fluorescência captados sob a forma de uma curva de amplificação (NAVARRO et al., 2015).

De acordo com a metodologia utilizada, a PCR quantitativa em tempo real pode gerar dados absolutos e dados relativos. Na RTq-PCR absoluta é necessário se fazer uma curva padrão por meio de diluições seriadas. A curva padrão mostra uma relação linear entre o limiar do ciclo (C_T - *threshold cycle*) e a quantidade inicial de RNA ou cDNA; considera-se que a curva e as amostras possuem semelhanças em termos de eficiência de amplificação (WONG & MEDRANO, 2005; SUGDEN & WINTER, 2008). O C_T ocorre na fase exponencial da amplificação e é definido como o primeiro ciclo que o equipamento diferencia

a amplificação gerada por fluorescência acima dos “ruídos de fundo” (*background*). (BUSTIN, 2000; STRATAGENE, 2004).

Já na RTq-PCR relativa, a expressão de um gene é medida com base em um padrão externo ou uma amostra de referência, então, os resultados são gerados pela razão entre o gene marcado e a amostra de referência (WONG & MEDRANO, 2005).

A eficiência da normalização depende muito da escolha do gene usado como referência e a expressão do mesmo deve ser constante entre os tecidos e células testados; assim, há um consenso geral no uso de genes constitutivos como controles internos das análises de expressão em RTq-PCR (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008). Entretanto, vários estudos apontaram que os níveis de transcritos de genes constitutivos comumente usados podem variar de acordo com as condições do experimento. Além disso, um gene com expressão estável em determinado organismo pode não ter esta mesma característica em um organismo diferente (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008).

A RTq-PCR possui três fases principais: a fase exponencial, onde o produto de PCR aumenta exponencialmente, desde que os reagentes estejam disponíveis na reação; a fase linear, onde há um aumento linear do produto de PCR e a quantidade de reagentes começa a ficar limitada; e a fase *plateau*, alcançada depois de vários ciclos, onde a quantidade de produto de PCR não mudará pois nesta fase alguns reagentes já se esgotaram (YUAN et al., 2006).

Geralmente, a detecção quantitativa dos *amplicons* pode ser realizada através de duas principais metodologias: por meio de sondas fluorescentes específicas a determinados genes ou por agentes que se ligam a moléculas específicas de dsDNA, com base na transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET – *fluorescence resonance energy transfer*) (PFAFFL, 2004).

As sondas de hidrólise (sondas TaqMan, por exemplo), um tipo de formato de sonda, são específicas para a sequência alvo e são marcadas com um repórter na extremidade 5' e um *quencher* na extremidade 3'. O *quencher* reduz a fluorescência do repórter quando a sonda está intacta e a fluorescência é gerada pela clivagem da sonda anelada pela atividade da nuclease 5' presente na Taq polimerase (WONG & MEDRANO, 2005; BUSTIN, 2005).

Um exemplo de intercalante de DNA é O SYBR green I, que se liga ao sulco menor de dsDNA, o que resulta em uma emissão de fluorescência mil vezes maior do que quando está livre na solução. Quanto maior a quantidade de dsDNA presente na reação, maiores serão as ligações nas moléculas de DNA e as fluorescências emitidas pelo SYBR green; assim, qualquer amplificação de DNA que ocorre no tubo de reação é mensurada (VALASEK & REPA, 2005). O método de detecção com sondas é mais eficiente do que o uso de intercalantes de DNA, pois as sondas garantem a detecção apenas do *amplicon* marcado que é complementar ao oligonucleotídeo da sonda. Dessa maneira, produtos inespecíficos e dímeros de primers não são detectados (SUGDEN & WINTER, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão relativa do gene *GGR* (At4g38640) em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* que supostamente superexpressam esse gene, assim como verificar a associação entre os níveis de expressão do *GGR* e respostas alelopáticas das plantas selvagens e transgênicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar RTq-PCR relativa de amostras das linhagens denominadas 4GA, 4GB, 4GC e 4GM, transformadas para superexpressão de *GGR* e de plantas selvagens utilizando os genes de referência *ACT8* e *RAD23C*;
- Comparar os dados de RTq-PCR com os resultados previamente obtidos de bioensaios alelopáticos com extratos foliares das plantas transformadas e de plantas selvagens.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

As plantas transgênicas utilizadas são provenientes da transformação realizada por Toledo (2014), pelo método *floral dip* via *Agrobacterium tumefaciens*. Essas plantas foram produzidas para superexpressar o gene *GGR* e a seleção dos transformados já passou a segunda geração (T2), cuja transformação foi confirmada por PCRs.

As sementes de plantas selvagens e de linhagens superexpressando o gene *GGR* (At4g38640) - linhagens 4GA, 4GB, 4GC e 4GM - foram colocadas em potes contendo substrato autoclavado (Tropstrato HT Hortaliças[®] ou Bioplant[®]). As bandejas com os potes foram cobertas com um filme plástico e colocadas no escuro a 4° C durante 48 h, para sincronização da germinação. Os potes foram transferidos para uma sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, a 22° C. As sementes germinaram de 2 a 3 dias após a transferência para a sala de crescimento. Após a germinação, as plantas foram cultivadas por cinco semanas, quando as folhas das rosetas foram coletadas para extração de RNA total.

3.2. RNA Total

Após cinco semanas de cultivo, as folhas das rosetas das plantas foram coletadas (aproximadamente 100 mg de cada planta) e armazenadas em tubos de microcentrífuga devidamente identificados. Este procedimento foi realizado com três plantas selvagens (*wild type* – WT) e três plantas de cada linhagem citada, totalizando 15 tubos de amostras: selvagens 1, 2, 3; 4GA 2, 5, 8; 4GB 1, 2, 9; 4GC 1, 2, 3 e 4GM 1, 2, 6. O conjunto de tubos foi imerso em nitrogênio líquido e, logo em seguida, os tubos foram armazenados na temperatura de -80° C.

Os procedimentos envolvendo a manipulação de RNA foram realizados em capela esterilizada com hipoclorito e etanol 70% e em baixas temperaturas, utilizando gelo e centrífuga refrigerada. As vidrarias foram esterilizadas por meio de aquecimento a 180° C em estufa (overnight). Os materiais plásticos, tais como pistilos e provetas, foram colocados de molho em solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 min. Em seguida, foram enxaguados com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01%, para inativação de RNases e autoclavados a 120° C por 20 min. Todos os materiais plásticos descartáveis, tais como tubos e ponteiras, foram autoclavados sob as mesmas condições mencionadas.

3.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA total de amostras de folha de *A. thaliana* (transgênica e selvagem) foi realizada conforme as instruções do fabricante do reagente TRIzol™ (Invitrogen™).

Cada amostra foliar foi macerada com auxílio de pistilos no próprio tubo, com adição de nitrogênio líquido. Cada tubo continha 100 mg de tecido foliar e se adicionou 1 mL de TRIzol™, e incubado por 5 min à temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio em cada amostra por cada mL de TRIzol® utilizado. Em seguida os tubos foram agitados em vórtex por 15 s e incubados por 3 min à temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas a 12.000 g durante 15 min em centrífuga refrigerada a 4° C. Após a centrifugação se coletou o sobrenadante contendo o RNA total das amostras. A fase aquosa foi retirada e colocada em um novo tubo de microcentrífuga identificado. A esta fase, adicionou-se 500 µL de isopropanol para cada mL de TRIZOL™ utilizado e as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 min.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 g durante 10 min a 4° C. O precipitado de RNA foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 75%, seguida da agitação em vórtex e centrifugação a 7.500 g durante 5 min a 4° C. O etanol foi descartado e os tubos foram deixados em capela durante 10 min, para que os precipitados secassem. O RNA foi ressuspenso em água *nuclease-free* (Invitrogen™) sem tratamento com DEPC e armazenado a -80° C para uso posterior.

3.2.2. Checagem da Integridade de RNA total

A integridade das moléculas de RNA total foi verificada em gel desnaturante de agarose 1,2% submetido a eletroforese. O gel continha 10% de MOPS 10X (MOPS 0,2 M; acetato de sódio 50 mM, EDTA pH 8 10 mM), 5% de formaldeído e o volume final foi completado com água DEPC 0,01%.

As amostras para o gel foram preparadas com tampão de amostra (Sigma™), RNA na proporção de 2:1 e 0,5 µL de brometo de etídio. As amostras foram desnaturadas em banho-maria a 65° C durante 15 min, em seguida, colocadas em gelo e aplicadas nos devidos poços. Para a corrida do gel, o tampão utilizado continha MOPS 1X e a voltagem utilizada de 70 V por 1 h e 30 min. A visualização do gel foi feita sob luz UV em fotodocumentador.

3.2.3. Tratamento com DNase e Quantificação do RNA total

O tratamento do RNA com DNase foi realizado com kit Purelink™ (Ambion™), seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, foram utilizados 12 µL de RNA de cada amostra aos quais foram adicionados 2 µL de Buffer DNase, 2 µL de DNase e 4 µL de água *nuclease-free*, resultando em um volume final de 20 µL. O conteúdo foi incubado à temperatura ambiente por 15 min e em seguida, adicionou-se 2 µL de EDTA 25 mM às reações. Os tubos de PCR foram levados ao termociclador a 65° C durante 10 min para a inativação da enzima DNase por meio do aumento da temperatura.

O RNA tratado com DNase foi quantificado em nanoespectrofotômetro NanoPhotometer™ (Implen™), onde as concentrações das amostras são mostradas em ng/µL⁻¹ e as absorbâncias medidas pela razão A260/A280 nm. As amostras foram armazenadas a -80° C.

3.3. Síntese de cDNA

Procedeu-se à síntese de cDNA com utilização do kit Improm-II Reverse Transcriptase™ (Promega™) conforme instruções do fabricante. Em tubos de PCR estéreis e pré-resfriados em gelo, foram colocados 1 µg de RNA tratado com DNase, 0,5 µg de primer oligo(dT), que hibridiza na cauda poli (A) do mRNA, e água *nuclease-free* para um volume final de 5 µL. Os tubos incubados em termociclador a 70° C por 5 min e 4° C por 5 min. De acordo com a concentração de cada amostra, foram preparados 15 mixes individualmente, compostos de água *nuclease-free*, Improm-II buffer, MgCl₂ 25 mM, inibidor de ribonuclease RNasin™ (Promega™) e enzima transcriptase reversa Improm-II™, com volume final de 15 µL.

As amostras de RNA previamente incubadas com o oligo (dT) foram adicionadas ao mix mencionado anteriormente, formando um volume final de 20 µL por reação. Os tubos

foram colocados em termociclador em um ciclo de 5 min a 25° C, 60 min a 42° C e 15 min a 70° C, correspondendo às etapas de anelamento, extensão e inativação da enzima transcriptase reversa, respectivamente. Em seguida, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20° C.

3.4. Verificação de contaminação de RNA mensageiro com DNA genômico

Após a síntese de cDNA e adicionalmente ao tratamento das amostras com DNase, verificou-se a ausência de contaminação com DNA genômico (gDNA) por meio de ensaios de PCR. Para tanto, foram utilizados dois pares de primers que amplificam os genes constitutivos actina 2 (primer *actin2 forward* e *reverse*) e fator de alongamento (primer *EF1α forward* e *reverse*) (Tabela 4). Os correspondentes pares de primers foram desenhados de maneira que se anelassem a éxons diferentes, com pelo menos um íntron entre as regiões a serem hibridizadas.

Além da adição dos primers mencionados, as reações foram preparadas com o kit composto de Taq DNA Polimerase, tampão de PCR e cloreto de magnésio (Invitrogen™), dNTP mix (Sigma™), água milliQ e o DNA molde correspondente: amostras de cDNA (ver subitem 3.2), um controle negativo com água (*no template control* – NTC) e um controle positivo com DNA de *Arabidopsis thaliana* selvagem. O DNA usado como controle positivo proveio de uma planta com três semanas de idade, diferente das amostras de cDNA utilizadas nos experimentos seguintes (cinco semanas).

A PCR foi realizada da seguinte forma:

- Desnaturação a 94° C por 4 min, seguida por:
- 35 ciclos de amplificação.
 - 94° C por 45 s; 50° C por 1 min; 72° C por 1 min;
- Extensão final a 72° C por 5min.

Os resultados das PCRs foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Como apresentado na Tabela 4, os amplicons de 131 pb e 404 pb das reações com os primers *actin2* e *EF1 α* , respectivamente, indicam que os cDNAs das amostras não estão contaminados com DNA genômico.

Tabela 4. Sequência dos primers utilizados para checar a ausência de DNA genômico nas amostras de cDNA utilizadas em PCR em Tempo Real.

Primer	Sequência do primer (5'-3')	Tamanho esperado do amplicon - oriundo de mRNA	Tamanho do amplicon contaminado com DNA genômico
<i>actin2 forward</i>	TAACTCTCCCGCTATGTATGTCGC	131 pb	209 pb
<i>actin2 reverse</i>	GAGAGAAACCCTCGTAGATTGGC		
<i>EF1α forward</i>	GCACTGTCATTGATGCTCC	404 pb	497 pb
<i>EF1α reverse</i>	GTCAAGAGCCTCAAGGAGAG		

3.5. PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real (RTq-PCR) foi utilizada para quantificar a expressão relativa do gene *GGR* (At4g38640) em plantas selvagens e em linhagens que superexpressam o gene mencionado. Para cada linhagem foram analisados três indivíduos (triplicatas biológicas): selvagem 1, 2, 3; 4GA 2, 5, 8; 4GB 1, 2, 9; 4GC 1, 2, 3 e 4GM 1, 2, 6. Os indivíduos foram analisados em triplicatas técnicas nos experimentos de RTq-PCR. Foi adquirida a sonda TaqMan® para ensaio com o gene *GGR* e as sondas TaqMan® para os ensaios dos controles endógenos referentes aos genes actina 8 (*ACT8* - At1G49240) e *RAD23C* receptor de ubiquitina (*RAD23C* - At3G02540).

Os ensaios TaqMan® adquiridos possuem os seguintes componentes: um par de primers específicos; uma sonda marcada com fluoróforo VIC® (no caso de *GGR*) ou FAM®

(*RAD23C* e *ACT8*) na extremidade 5' e uma molécula “*quencher*” MGB (*minor groove binder* - ligante do sulco menor) na extremidade 3'.

Antes dos ensaios de expressão relativa do gene *GGR*, foram feitas diluições seriadas de cDNA para verificar quais das diluições apresentariam as melhores curvas detectadas pelo software. Assim, foi feito um pool das três repetições biológicas de cada uma das linhagens (4GA, 4GB, 4GC e 4GM), diluído em cinco pontos: 1:5 (ou 2^{-1}), 1:25 (4^{-2}), 1:125 (8^{-3}), 1:625 (16^{-4}) e 1:3.125 (32^{-5}). A sonda utilizada para o experimento de diluição foi a *GGR* pois havia mais conteúdo em μL em relação às outras duas, então, seu uso não comprometeria os próximos ensaios.

Utilizou-se as instruções do fabricante de TaqMan® Universal Master Mix II com UNG (Applied Biosystems) para o preparo das reações de cada alvo, em triplicatas. Estas foram preparadas para um volume final de 10 μL , composto de 5 μL de TaqMan® Universal Master Mix II; 4,5 μL de mix composto de cDNA e água milliQ autoclavada (1:5) e 0,5 μL da sonda Taqman® correspondente ao ensaio.

Todas as reações foram colocadas em placas de reação MicroAmp® (Applied Biosystems™) de 96 poços, submetidas à amplificação em termociclador StepOne® (Applied Biosystems™) sob as seguintes condições: 50° C por 2 min, para incubação da *uracil-N-glycosylase* - UNG); 95° C por 10 min, para a ativação da polimerase; 40 ciclos de 95° C por 15 s (desnaturação) e 60° C por 1 min (anelamento/ extensão). As análises da expressão foram feitas com utilização do software StepOne™ versão 2.3.

A quantidade relativa do gene de interesse foi obtida pela utilização do método de comparação de C_T ($\Delta\Delta C_T$). Este método é um modelo matemático que calcula as mudanças de expressão gênica através da diferença relativa entre a amostra do experimento e o gene de referência (WONG & MEDRANO, 2005). O software StepOne™ determinou a quantidade

relativa do gene em estudo por meio de comparação entre a quantidade em cada amostra do gene alvo (*GGR*) e a quantidade nas amostras de referência (*ACT8* e *RAD23C*).

Os dados da quantidade absoluta obtidos foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste-t de Student a 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Integridade das amostras utilizadas para PCR em Tempo Real

As amostras de RNA total tiveram sua integridade preservada como pode ser observado na Figura 14. Nota-se que as bandas de RNA ribossomal 28S (bandas superiores) são mais intensas do que as bandas 18S (inferiores). As diferenças de intensidades entre as amostras mostram diferenças de concentração. Nesse ponto não houve a preocupação de se fazer um carregamento dos poços com as mesmas quantidades de RNA. Porém, os valores foram quantificados e equalizados para as análises posteriores, como por exemplo para a síntese de cDNA.

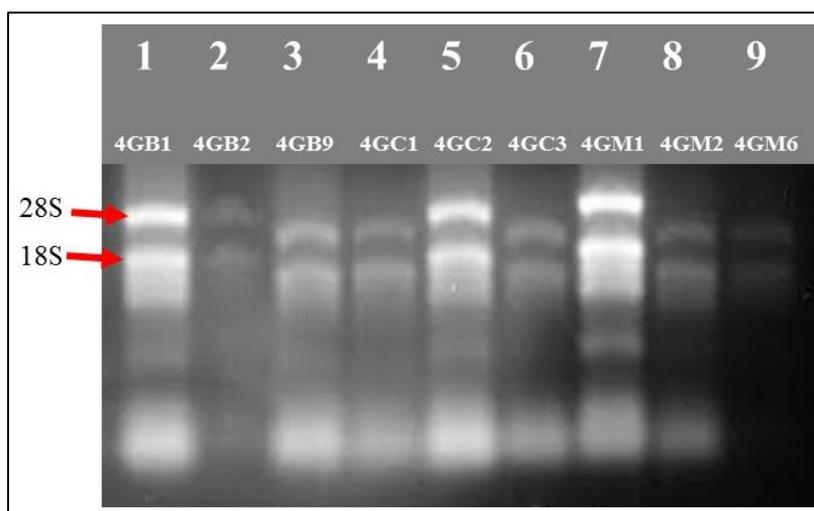


Figura 14. Gel desnaturante de agarose 1,2% corado com brometo de etídio para checagem da integridade de RNA. As bandas das subunidades de RNA ribossomal 28S (superiores) e 18S (inferiores) mostram a integridade do RNA. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) 4GB 1; (2) 4GB 2; (3) 4GB 9; (4) 4GC 1; (5) 4GC 2; (6) 4GC 3; (7) 4GM1; (8) 4GM 2; (9) 4GM 6.

Com o propósito de utilizar amostras de cDNA livre de contaminação genômica, o cDNA sintetizado (subitem 3.3) foi submetido a PCR com primers que se anelam a diferentes éxons, o que permite a distinção entre cDNA e DNA “nativo”. Para tanto, foram utilizados dois pares de primers que amplificam os genes constitutivos actina 2 (primer *actin2 forward* e *reverse*) e fator de alongamento (primer *EF1 α forward* e *reverse*).

Conforme detalhado na Tabela 4 (subitem 3.4), a ausência de contaminação por DNA genômico, com o uso dos primers para o gene da *actin2* que gerou fragmentos de cDNA (*amplicons*) de 131 pb. A Figura 15 revela que o tamanho dos *amplicons* foi consistente com o esperado, ou seja, de aproximadamente 131 pb em todas as amostras testadas. Além disso, percebe-se que a amostra de DNA de *A. thaliana*, usada como controle positivo, apresentou banda de aproximadamente 209 pb, mostrando que essa amostra continha DNA genômico (Figura 15). Os *amplicons* dos cDNAs amplificam menores números de pares de base devido ao processo de remoção de íntrons (*splicing*) e junção dos éxons, que ocorre após a transcrição do RNA.

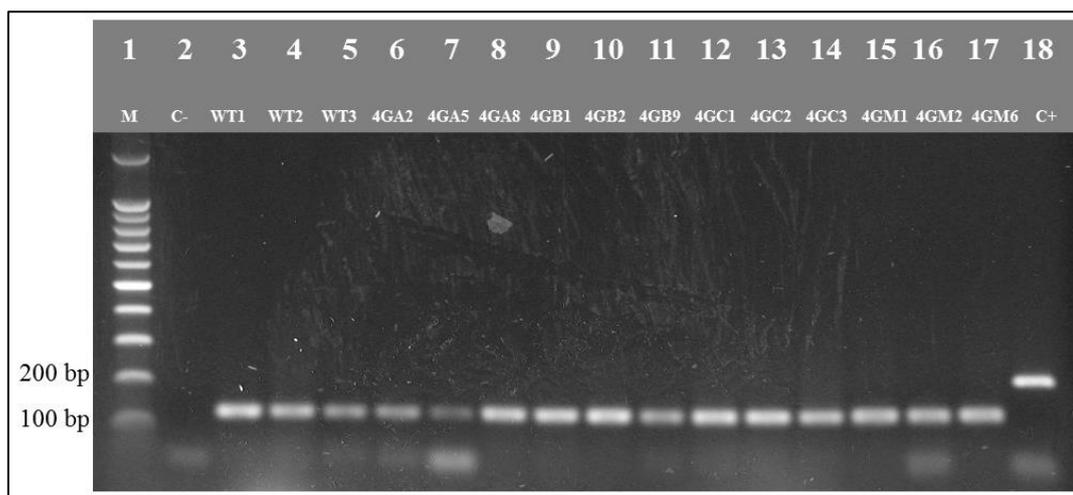


Figura 15. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Produtos de PCR com o primer *actin2* demonstram que as amostras de cDNA estão livres de contaminação por DNA genômico. As amostras de cDNA apresentam amplicons de 131 pb enquanto a amostra de DNA (controle positivo) apresenta 209 pb. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™); (2) Controle negativo (NTC) - água; (3); Selvagem (WT) 1; (4) Selvagem (WT) 2; (5) Selvagem (WT) 3; (6) 4GA 2; (7) 4GA 5; (8) 4GA 8; (9) 4GB 1; (10) 4GB 2; (11) 4GB 9; (12) 4GC 1; (13) 4GC 2; (14) 4GC 3; (15) 4GM 1; (16) 4GM 2; (17) 4GM 6; (18) Controle positivo – DNA de *Arabidopsis thaliana* selvagem.

Os primers *EF1 α* não resultaram em amplificação na maioria das amostras analisadas, inclusive do DNA da planta selvagem de *A. thaliana* usado como controle positivo (Figura 16). Entretanto, as amostras que amplificaram com o primer *EF1 α* apresentaram aproximadamente fragmentos de 404 pb - WT 1, 4GB 1, 4GC 2, 4GC 3, 4GM 1 e 4GM 6. Este é o tamanho esperado como indício da ausência de DNA genômico.

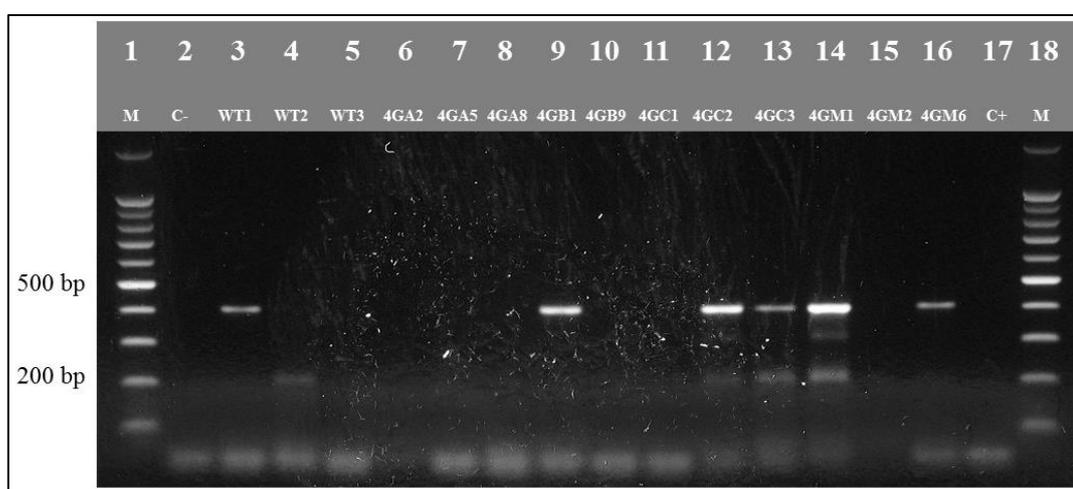


Figura 16. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com produtos de PCR com os primers que amplificam o gene *EF1 α* . As amostras de cDNA apresentam amplicons de 404 pb. A amostra de DNA selvagem (controle positivo) não amplificou. Relação das amostras aplicadas no gel: (1) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™); (2) Controle negativo (NTC) - água; (3) Selvagem (WT) 1; (4) Selvagem (WT) 2; (5) Selvagem (WT) 3; (6) 4GA 2; (7) 4GA 5; (8) 4GA 8; (9) 4GB 1; (10) 4GB 9; (11) 4GC 1; (12) 4GC 2; (13) 4GC 3; (14) 4GM 1; (15) 4GM 2; (16) 4GM 6; (17) Controle positivo – DNA de *Arabidopsis thaliana* selvagem; (18) Marcador Molecular 100 bp (Invitrogen™).

4.2. PCR em Tempo Real

Os resultados mostraram que não houve diferença significativa quanto à expressão média de *GGR* entre as plantas de uma mesma linhagem. Semelhantemente, a comparação para os dois genes de referência *ACT8* (Figura 17) e *RAD23C* (Figura 18), também não mostraram variações significativas de expressão nas plantas selvagens (WT). Quando comparadas as médias de expressão desses genes entre plantas selvagens (WT) e as linhagens transgênicas, verificou-se que não houve diferença significativa entre as plantas analisadas,

com exceção da linhagem 4GM (Figuras 17 e 18). A ANOVA mostrou que houve diferenças entre as médias de expressão de *ACT8* e *RAD23C* obtidas comparadas nessa linhagem e os valores observados no WT.

As Figuras 17 e 18 mostram a expressão relativa, em plantas WT e transgênicas, do gene *GGR* e os de referência *ACT8* (At1G49240) e *RAD23C* (At3G02540), respectivamente.

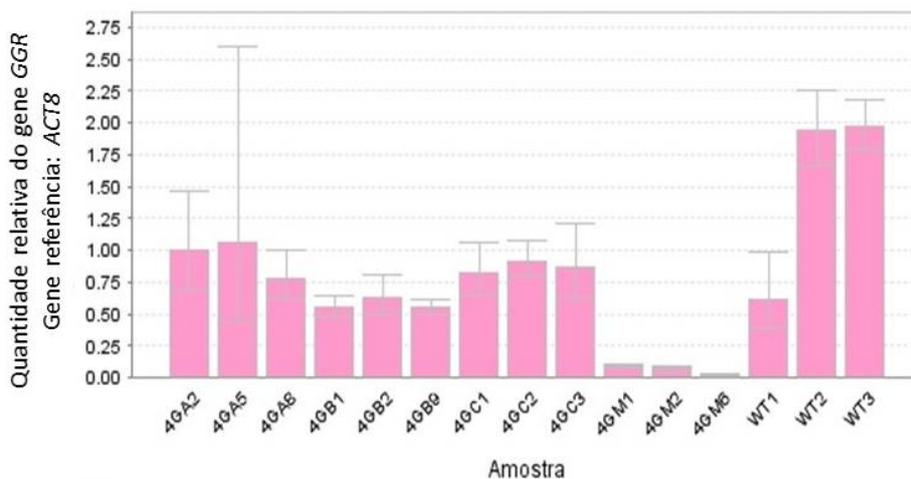


Figura 17. Expressão relativa do gene *GGR* em relação ao gene de referência *ACT8* (AT1G49240) em amostras foliares de *Arabidopsis thaliana* com cinco semanas de idade.

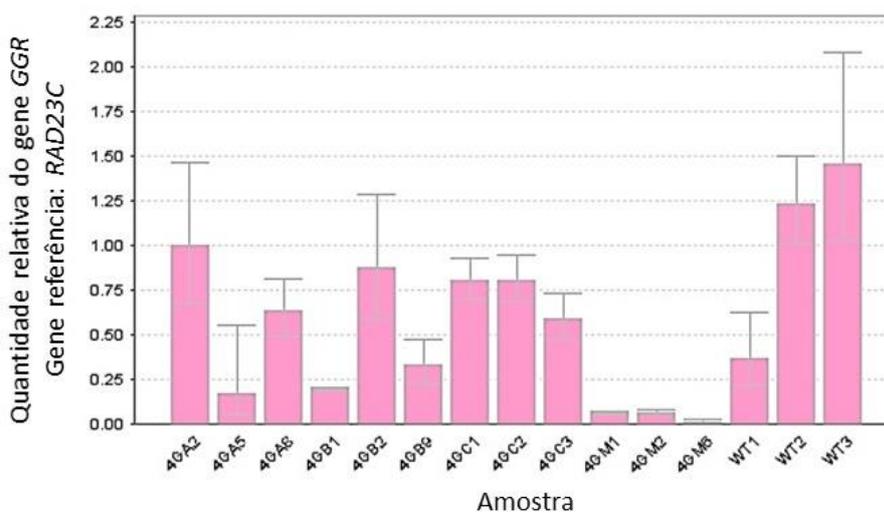


Figura 18. Expressão relativa do gene *GGR* em relação ao gene de referência *RAD23C* (At3G02540) em amostras foliares de *Arabidopsis thaliana* com cinco semanas de idade.

Com relação ao gene de referência *ACT8*, nas plantas selvagens a média da expressão relativa de *GGR* variou de 1,6 a aproximadamente 3 vezes àquela verificada para as linhagens 4GA, 4GB e 4GC. A linhagem onde se verificou a maior diferença na média de expressão relativa de *GGR* foi 4GM (26 vezes), sendo esse valor significativamente diferente das plantas WT. Embora as demais linhagens não tenham tido diferenças estatisticamente significativas das plantas WT, os resultados sugerem que as linhagens transgênicas de *GGR* expressaram esse gene em menores quantidades.

De forma semelhante, quando se considera o gene de referência *RAD23C*, a expressão média relativa de *GGR* em plantas transformadas foi menor nas linhagens transgênicas em comparação com plantas WT. Em termos de valores, a expressão média relativa do gene entre as linhagens transgênicas variou de 1,39 a 23 vezes menor que nos WT. Novamente, a linhagem 4GM teve a mais baixa expressão relativa de *GGR*, 23 X menor que nas plantas WT.

Os resultados mostram que para os dois genes de referência, o gene *GGR* foi mais expresso nas plantas WT. Embora as linhagens 4GA, 4GB e 4GC não apresentara expressão relativa média significativa de *GGR* comparada com WT, a tendência de que as plantas transgênicas expressaram em menor grau o *GGR* foi consistente em todas as análises. Adicionalmente, tanto com o gene de referência *ACT8* quanto com *RAD23C*, a linhagem 4GM apresentou diferença significativa de expressão muito menor de *GGR* em relação as WT.

Ao analisar os gráficos (Figuras 17 e 18), percebe-se que o ensaio com o gene *ACT8* como controle endógeno, apresentou um padrão de valores mais uniformes em comparação com *RAD23C* como controle endógeno.

5. DISCUSSÃO

5.1. Amostras de cDNA e genes de referência utilizados em PCR em Tempo Real

A qualidade das amostras de RNA é uma característica crucial para os ensaios de RTq-PCR, pois isso determina a reprodutibilidade e a relevância dos resultados. A purificação de RNA exige mais cuidados em comparação com a molécula de DNA, e para que seja incluído em ensaios de RTq-PCR é necessário seguir alguns critérios rígidos, como por exemplo, estar livre de contaminação com DNA e nucleases (BUSTIN & NOLAN, 2004).

Esses cuidados são necessários, pois nos experimentos envolvendo RT-PCR é possível a contaminação do RNA com DNA genômico (gDNA), o que não é apropriado e pode gerar resultados denominados de falso-positivos. Para fazer a distinção entre RNA e DNA molde, são utilizados pares de *primers* que se ligam a diferentes éxons, assim, as moléculas de DNA e de cDNA são amplificadas com tamanhos distintos (MARTEL; GRÜNDEMANN; SCHÖMIG, 2002).

Para o presente trabalho, esta checagem foi feita com as amostras de cDNA sintetizadas com o intuito de verificar se as amostras estavam próprias para os ensaios de PCR em tempo real. Por meio de PCR com o primer actin2 (ACT2), as amostras foram consideradas apropriadas para tal finalidade, uma vez que não apresentaram vestígios de gDNA. O primer em questão se anela especificamente ao gene ACT2.

Arabidopsis thaliana possui oito genes funcionais para actina, que estão divididos em duas subclasses, de acordo com a filogenia e os padrões de expressão. Uma dessas subclasses é composta pelos genes ACT2, ACT7 e ACT8, os quais são fortemente expressos nos tecidos vegetais (NISHIMURA et al., 2003). Os genes ACT2 e de ACT8 possuem expressão constitutiva e elevada na maioria dos tecidos vegetais de *Arabidopsis*, onde foram reportados com maior intensidade em raízes, caules, folhas e com menor intensidade em sílicas (AN et

al., 1996). O fato de que o *ACT2* tem expressão constitutiva em tecidos foliares foi preponderante na escolha deste gene para ser usado como referência.

O fator de alongação (*EF1 α*) está entre os genes considerados como constitutivos, juntamente com outros tais como poliubiquitina (*UBQ*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e β -tubulina (*TUB*). Estes genes foram classificados como constitutivos na era pré-genômica por estarem envolvidos em processos celulares básicos, porém, nem sempre os níveis de transcritos destes genes são estáveis (CZECHOWSKI et al., 2005).

5.2. Análise de expressão relativa do gene *GGR* em *Arabidopsis thaliana*

Os resultados dos ensaios de PCR em tempo real mostraram que as médias de expressão relativa do gene *GGR* em plantas WT foram consistentemente maiores que aquelas observadas nas plantas *GGR*-transformadas das linhagens 4GA, 4GB e 4GC. É importante salientar que apenas a 4GM, que apresentou expressão relativa de *GGR* significativamente diferente de WT, onde a expressão foi de 26 e 23 vezes menor do que em plantas selvagens para os genes de referência *ACT2* e *RAD23C*, respectivamente (Figuras 17 e 18). Esse fato causa surpresa, visto que o esperado era que as plantas transformadas estariam superexpressando *GGR*, uma vez que este gene está sobre o controle do promotor CaMV (*Cauliflower mosaic vírus*) 35S.

O promotor CaMV35S é o mais utilizado em plantas transgênicas e possui muitas vantagens, porém, sua aplicação também pode apresentar algumas fragilidades. Um dos potenciais riscos envolvidos no uso excessivo do promotor CaMV35 é o fenômeno de silenciamento de genes (CHEN et al., 2013). Dentre algumas das possibilidades que podem explicar as variações dos níveis de expressão do transgene podem ser citados: o local onde ocorre a inserção do transgene no cromossomo e o número de transgenes inseridos em cada local de inserção de um mesmo cromossomo (STAM; MOL; KUTTER, 1997).

Agrobacterium tumefaciens tem sido usada na transformação de plantas. Contudo, existem alguns problemas decorridos do uso deste método, como menor número de cópias transgênicas comparado com outros métodos; inserção de alto número de cópias de T-DNA, que podem afetar a estabilidade da expressão do transgene e resultar na indução de mecanismos de silenciamento (OLTMANN et al., 2010).

Uma das classes do fenômeno de silenciamento é baseado na regulação epigenética de genes. Esse mecanismo de inativação que pode surgir quando múltiplas cópias da mesma sequência ou de sequência homóloga são introduzidas em um genoma (RAJEEVKUMAR; ANUNANTHINI; SATHISHKUMAR, 2015). Este silenciamento é denominado silenciamento dependente de homologia (SGDH), conhecido também como co-supressão.

As plantas de *Arabidopsis* transformadas visando a superexpressão de *GGR* usadas neste estudo podem estar vivenciando um processo de co-supressão. Assim, a menor expressão relativa dos genes *GGR* (endógeno e cópias introduzidas) nas plantas transformadas para superexpressá-lo podem ter sido suprimidos em diferentes graus por esse processo.

No presente trabalho, as plantas selvagens e as plantas transformadas apresentaram fenótipo normal, aparentemente. Porém, não foram realizados estudos detalhados dos órgãos e estruturas das plantas a fim de verificar possíveis alterações fenotípicas. No caso de fenótipos, por exemplo, sabe-se que a superexpressão de um gene endógeno pode resultar em um fenótipo idêntico ao do organismo modificado para perda de função (PRELICH, 2012). Provavelmente, este mimetismo causa interferências em algum nível da proteína e seus complexos, que faz com que atue de maneira antagônica (PRELICH, 2012).

Nos gráficos (Figuras 17 e 18) nota-se que a amostra de planta selvagem “WT 1” apresentou um nível de expressão de *GGR* inferior às demais plantas selvagens analisadas (WT 2 e WT 3). Possivelmente, esta discrepância ocorreu por alguma característica da planta

que não foi percebida no momento da coleta do material foliar, ainda que as plantas utilizadas tenham sido selecionadas com padrões visuais semelhantes e aparentavam-se saudáveis.

5.3. Expressão do gene *GGR* e Alelopatia

As plantas sintetizam uma grande quantidade de fitoquímicos que desempenham funções especializadas em interações ecológicas. Dentre estes fitoquímicos, os terpenos representam a classe de metabólitos especializados (ou metabólitos secundários) mais diversa e mais especializada. *Arabidopsis thaliana* é capaz de sintetizar uma diversidade destes metabólitos (THOLL & LEE, 2011a). Terpenos são sintetizados na maioria dos órgãos de *A. thaliana* por enzimas terpeno sintases (TPSs). As TPSs geralmente catalisam a formação de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos a partir dos precursores de terpenos geranyl difosfato (*GPP*), farnesil difosfato (*FPP*) e geranyl geranyl difosfato (*GGPP*), respectivamente (THOLL & LEE, 2011b).

Adicionalmente, a associação entre terpenos e alelopatia foi demonstrada através de alguns trabalhos envolvendo espécies nativas. Essas espécies sintetizam terpenos que estavam presentes nos extratos usados para determinar a reposta alelopática das plantas. Assim, extratos foliares de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) inibiram a germinação de alface (*Lactuca sativa* var. *grand rapids*) e picão (*Bidens pilosus*). Entretanto, não foi possível a identificação de quais tipos de terpenos estavam presentes nos extratos (SILVA et al., 2006).

Como já mencionado, as plantas superexpressando o gene *GGR* analisadas no presente estudo de RTq-PCR são provenientes da transformação realizada por Toledo (2014). Neste mesmo trabalho, a autora constatou o efeito inibitório de extratos aquosos de *A. thaliana* selvagens e transformadas (na geração T1) sobre sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), conforme mostrado na Tabela 2.

Em adição, Pierdoná (dados não publicados, 2015) estudou o efeito alelopático da linhagem 4GB de extratos foliares usando solventes orgânicos (hexano 70% e acetato de etila 30%). Além disso, a medida de concentração do extrato ppm (partes por milhão) nas quantidades que se seguem: 2.000 ppm, 1.000 ppm e 500 ppm. O uso de solventes orgânicos é mais eficiente na extração de terpenos que a extração aquosa (JOHNSON, HULL-SANDERS, MEYER, 2007).

Os resultados foram similares aos obtidos com extratos aquosos. Constatou-se que os extratos das plantas transformadas inibiram o crescimento das plântulas em todas as concentrações em relação ao controle (água). A concentração do extrato de 2.000 ppm inibiu significativamente o crescimento das raízes das plantas alvo (gergelim). A partir desses trabalhos pode-se concluir que *A. thaliana* selvagem possui efeitos fitotóxicos e que as linhagens transgênicas potencializam esses efeitos. Entretanto, está claro que as plantas analisadas não superexpressaram o gene *GGR* como demonstrado pelos experimentos de RTq-PCR.

Como citado anteriormente, alguns experimentos *in vitro* demonstraram que por si mesmo *GGR* não é uma enzima *GGPPS* ativa. Assim, este gene foi reclassificado como membro da classe de genes prenil difosfato sintase, dentro da subfamília de proteínas denominada *GPP* sintase II de “subunidade pequena” (SSU-II, do inglês *GPP synthase small subunit*). Apesar de possuir a menor similaridade dentre os 12 genes da família *GGPPS* em *A. thaliana*, o *GGR* pode ser ativo como heterodímero em junção com At4g36810, resultando em uma enzima *GGPPS* envolvida na síntese de monoterpenos (WANG & DIXON, 2009; BECK et al., 2013). Em plantas, o *GGR* reduz o geranyl geranyl difosfato (*GGPP*) em fitildifosfato (KELLER et al., 1998). Por sua vez, o fitildifosfato é um precursor para a biossíntese de tocoferóis, clorofila e filoquinonas (VALENTIN et al., 2006; MURAKAMI et al., 2007).

Conforme mencionado no presente estudo, as plantas transformadas apresentaram maior efeito inibitório sobre o crescimento de plântulas de gergelim e apresentaram os menores níveis de transcritos *GGR*. Já as plantas selvagens, apresentaram os maiores níveis de expressão de *GGR* e um menor efeito fitotóxico sobre as plântulas de gergelim. Tal ocorrência pode ser explicada pela maior quantidade de geranyl geranyl difosfato (*GGPP*), precursor de terpenos, disponível nas plantas transformadas, uma vez que o *GGR* é uma enzima que utiliza *GGPP* como substrato para a síntese de outras moléculas. Outra possibilidade é que a redução do gene *GGR* pode afetar outras vias metabólicas, não necessariamente de terpenos, envolvidas em processos de aleloquímicos.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo, constatou-se que as plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana* expressaram mais o gene *GGR* em comparação com as linhagens 4GA, 4GB, 4GC e 4GM, que supostamente superexpressavam esse gene. Esse dado pode indicar que um processo de cossupressão de *GGR* pode ter ocorrido nas plantas transgênicas. Estudos prévios sobre as respostas alelopáticas mostram que extratos foliares de *Arabidopsis thaliana* transformadas para superexpressão de *GGR* possuem maior efeito alelopático do que os extratos de plantas selvagens. Assim, quanto menor o nível de expressão de *GGR* maior a resposta alelopática da planta. Uma possível explicação para isso se baseia no fato de que a menor expressão de *GGR* disponibilizaria mais substrato para a enzima *GGPP* sintase e conseqüentemente, maior produção de terpenos. Outra possibilidade é que a redução da expressão de *GGR* poderia induzir outras vias metabólicas que aumentam a produção de compostos alelopáticos.

Para um melhor entendimento da relação destes genes a compostos alelopáticos são necessários mais estudos complementares nesta área. Assim, seria importante realizar bioensaios com extratos foliares de plantas selvagens e de plantas de todas as linhagens

analisadas por PCR em Tempo Real, seguindo a metodologia de extração com solvente orgânico (JOHNSON, HULL-SANDERS, MEYER, 2007). A continuidade dos estudos relacionados ao silenciamento dos genes por meio de RNA de interferência também é muito importante para dar ainda mais suporte a esta linha de pesquisa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AN, Y-Q; MCDOWELL, J.M.; HUANG, S.; MCKINNEY, E.C.; CHAMBLISS, S.; MEAGHER, R.B. (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. **The Plant Journal**, v. 10, n. 1, pp. 107-121.

BAULCOMBE, D. (2004) RNA Silencing in Plants. **Nature**, v. 431, pp. 356-363.

BECK, G.; COMAN, D.; HERREN, E.; RUIZ-SOLA, M.A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; GRUISSEM, W.; VRANOVÁ, E. (2013) Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, 82, pp. 394-416.

BEDOYA-PÉREZ, M.A.; ISLER, I.; BANKS, P.B.; MCARTHUR, C. (2014) Roles of the volatile terpene, 1,8-cineole, in plant-herbivore interactions: a foraging odor cue as well as a toxin? **Oecologia**, v. 174, pp. 827-837.

BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (ed.) (1998) **Manual de transformação genética de plantas**. 1.ed. Brasília: Embrapa – SPI.

BRASILEIRO, A.C.M.; CABRAL, G.B.; SILVA, M.C.M. (2015) Transformação de planta-modelo via *Agrobacterium* spp. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (ed.) **Manual de Transformação genética de plantas**. 2.ed. Brasília: Embrapa, pp. 105-137.

BROWN, T.A. (2003) **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed.

BUCKINGHAM, S. (2003) The Major World of microRNAs. Disponível em <<http://www.nature.com/horizon/rna/background/pdf/micrnas.pdf>> Acesso em 16.ago.2013 às 22h10min.

BUSTIN, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, pp. 169-193.

BUSTIN, S.A.; NOLAN, T. (2004) Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 3, pp. 155-166.

BUSTIN, S.A. (2005) Real time PCR. In: FUCHS, J.; PODDA, M. (ed.). **Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Inc, pp. 1117-1125.

CARRETERO-PAULET, L.; AHUMADA, I.; CUNILLERA, N.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FERRER, A.; BORONAT, A.; CAMPOS, N. (2002) 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. **Plant Physiology**, v. 129, pp. 1581-1591.

CHAO, Y.; KANG, J.; ZHANG, T.; YANG, Q.; GRUBER, M.Y.; SUN, Y. (2014) Disruption of the Homogentisate Solanesyltransferase gene results in albino and dwarf phenotypes and

root, trichome and stomata defects in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS ONE**, v.9 Issue 4, e94031, pp.

CHEN, Q.; FAN, D.; WANG, G. (2015) Heteromic geranyl(geranyl) diphosphate synthase is involved in monoterpene biosynthesis in *Arabidopsis* flowers. **Molecular Plant**, v. 8, n. 9, pp. 1434-1437.

CHEN, Z.; WANG, J.; YE, M-X.; LI, H.; JI, L-X.; LI, Y., CUI, D-Q.; LIU, J-M.; AN, X-M. (2013) A novel moderate constitutive promoter derived from poplar (*Populus tomentosa* Carrière) **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, pp. 6187-6204.

CLANCY, S.; BROWN, W. (2008) Translation: DNA to mRNA to Protein. Nature Education. Disponível em <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393>> Acesso em 16.ago.2013 às 19h30min.

CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, Issue 6, pp. 735-743.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites) In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (edit.) (2000) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists.

CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W-R. (2005) Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, pp. 5-17.

DAS, P.; JOSHI, N.C. (2011) Minor modifications in obtainable *Arabidopsis* floral dip method enhances transformation efficiency and production of homozygous transgenic lines harboring a single copy of transgene". **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2, pp. 59-67.

DELATORRE, C.A.; SILVA, A.A. (2008) *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 31, n. 2, pp. 58-67.

ELMAYAN, T.; BALZERGUE, S.; BÉON, F.; BOURDON, V.; DAUBREMET, J.; GUÉNET, Y.; MOURRAIN, P.; PAULAQUI, J.C.; VERNHETTES, S.; VIALLE, T.; WOSTRIKOFF, R.; VAUCHERET, H. (1998) *Arabidopsis* Mutants Impaired in Cossuppression. **The Plant Cell**, v. 10, pp. 1747-1757.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M.; BORGES, A.A.; BORGES-PÉREZ, A.; PÉREZ, J.A. (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BioMed Central Plant Biology**, v. 8, n. 1, pp. 131.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. (2000) Alelopatia: uma área emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Ed. Especial 12, pp. 175-204.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, pp. 806-811.

FRANÇA, N.R.; MESQUITA-JUNIOR, D.; LIMA, A.B.; PUCCI, F.V.C; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. (2010) Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, pp. 695-709.

GIULIANO, G. (2014) Plant Carotenoids: genomics meets multi-gene engineering. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, pp. 111-117.

GLICK, B.R. et al. (2009) **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4. ed. Washington DC: ASM Press.

GHEDIRA, R.; DE BUCK, S.; VAN EX, F.; ANGENON, G.; DEPICKER, A. (2013) T-DNA transfer and T-DNA integration efficiencies upon *Arabidopsis thaliana* root explant cocultivation and floral dip transformation. **Planta**, v. 238, pp. 1025-1037.

HARRISON, S.J.; MOTT, E.K.; PARSLEY, K.; ASPINALL, S.; GRAY, J.C.; COTTAGE, A. (2006) **Plant Methods**, v. 2, n. 19.

HIRAI, S.; KODAMA, H. (2008) RNAi Vectors for manipulation of gene expression in higher plants. **The Open Plant Science Journal**, 2, pp. 21-30.

JOHNSON, R.H.; HULL-SANDERS, H.M.; MEYER, G.A. (2007) Comparison of foliar terpenes between native and invasive *Solidago gigantea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, xx, pp. 1-10.

KELLER, Y.; BOUVIER, F.; D'HARLINGUE, A.; CAMARA, B. (1998) Metabolic compartmentation of plastid prenyl lipid biosynthesis – Evidence for the involvement of a multifunctional geranylgeranyl reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 251, pp. 413-417.

KLIEBENSTEIN, D.J. (2004) Secondary metabolites and plant environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses. **Plant, Cell & Environment**, v. 27, n. 6, pp. 675-684

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, v. 61, pp. 909-921.

LODISH, H. et al. (2007) **Molecular Cell Biology**. 6. ed. New York: **W.H. Freeman and Company**.

MARTEL, F.; GRÜNDEMANN, D.; SCHÖMIG, E. (2002) A simple method for elimination of false positive results in RT-PCR. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, pp. 248-250.

MARTINEZ, C.O. et al. (2005) Glifosato e glufosinato como agentes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) **Revista Brasileira de Herbicidas**, n. 3, pp. 18-34.

MATHEWS, C.K. et al. (2000) **Biochemistry**. 3.ed. Redwood City: The Benjamin Cummings Publ.

MEYEROWITZ, E.M. (2001) Prehistory and History of *Arabidopsis* Research. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, pp. 15-19.

MURAKAMI, M.; SHIBUYA, K.; NAKAYAMA, T.; NISHINO, T.; YOSHIMURA, T.; HEMMI, H. (2007) Geranylgeranyl reductase involved in the biosynthesis of archaeal membrane lipids in the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 3, pp. 805-814.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, pp. 473-497.

NAPOLI, C. et al. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. **The Plant Cell**, v.2, pp. 279-289.

NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTAÑO, M.J.; SOLERA, J. (2015) Real Time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, pp. 231-250.

NISHIMURA, T.; YOKOTA, E.; WADA, T.; SHIMMEN T.; OKADA, K. (2003) An *Arabidopsis ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. **Plant & Cell Physiology**, v. 44, n. 11, pp. 1131-1140.

OKADA, K. et al. (2000) Five Geranylgeranyl Diphosphate Synthases Expressed in Different Organs are Localized into Three Subcellular Compartments in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 122, pp. 1045-1056.

OLTMANN, H.; FRAME, B.; LEE, L-Y; JOHNSON, S.; LI, B.; WANG, K.; GELVIN, S.B. (2010) Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. **Plant Physiology**, v. 152, n. 3, pp. 1158-1166.

PRELICH, G. (2012) Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. **Genetics**, v. 190, n. 3, pp. 841-854.

PFAFFL, M.W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: Stephen A. Bustin (ed.) *A-Z of quantitative PCR*. 1. ed. La Jolla, CA: International University Line, pp. 87-112.

PHILLIPS, T. (2008) Small Non-coding RNA and Gene Expression. Nature Education. Disponível em <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/small-non-coding-rna-and-gene-expression-1078>> Acesso em 16.ago.2013 às 20h30min.

RAJEEVKUMAR; S.; ANUNANTHINI, P.; SATHISHKUMAR, R. (2015) Epigenetic silencing in transgenic plants. **Frontiers in Plant Science**, 6, 693. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>

RAMEL, F.; BIRTIC, S.; GINIES, C.; SOUBIGOU-TACCONAT, L.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; HAVAUX, M. (2012) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. **PNAS**, v. 109, n. 14, pp. 5535-5540.

RINN, J.L.; CHANG, H.Y. (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, pp. 145-166.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. (2001). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. **Plant Physiology**, v. 130, pp. 1079-1089

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (2006) **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor.

SHIPLEY, G.L. (2007) An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M.T. (ed.), **Real Time PCR**, New York: Taylor & Francis Group, pp. 1-37.

SILVA, G.B.; MARTIM, L.; SILVA, C.L.; YOUNG, M.C.M.; LADEIRA, A.M. (2006) Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Hoehnea**, v. 33, n. 3, pp. 331-338.

STAM, M.; MOL, J.N.M.; KOOTER, J.M. (1997) The silence of genes in transgenic plants. **Annals of Botany**, v. 79, pp. 3-12.

STRATAGENE (2004) **Introduction to Quantitative PCR – Methods and Application Guide**.

SUGDEN, D.; WINTER, P. (2008) Quantification of mRNA using Real Time RT-PCR: the SYBR solution. In: WALKER, J.M.; RAPLEY, R. (ed.) **Molecular Biomethods Handbook**. 2.ed. New Jersey: Humana Press, pp. 149-168.

SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKI A, FIGLEROWICZ M. (2003). RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, pp. 217-29.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature** 408, pp. 796-815.

TAIZ, L.; ZEIGER, T. (2004) **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed.

TAKANO, H.; OBITSU, S.; BEPPU, T.; UEDA, K. (2005) Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A(3)2: Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, pp. 1825-1832.

THOLL, D.; LEE, S. (2011a) Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book**.

THOLL, D.; LEE, S. (2011b) Elucidating the metabolism of plant terpene volatiles: alternative tools for engineering plant defences? In: GANG, D.R. (ed.) **The biological activity of phytochemicals**. New York: Springer, pp. 159-178.

TOLEDO, J.L. (2014) 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*). Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica.

TUR, C.M. et al. (2012) Alelopatia de extratos aquosos de cinamomo (*Melia azedarach* L. – Meliaceae) sobre a germinação e crescimento inicial do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. – Solanaceae). **Revista Biotemas**, v. 25, n. 3, pp. 49-56.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. (2005) The power of real time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, pp. 151-159.

VALDUGA, E. et al. (2009) Produção de carotenoides: Microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, pp. 2429-2436.

VALENTIN, H.E.; KIM LINCOLN, K.; MOSHIRI, F.; JENSEN, P.K.; QUNGANG QI, Q.; VENKATESH, T.V.; KARUNANANDAA, B.; BASZIS, S.R.; NORRIS, S.R.; SAVIDGE, B.; GRUYS, K.J.; LAST, R.L. (2006) The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. **The Plant Cell**, v. 18, n. 1, pp. 212-224.

VALVEKENS, D.; MONTAGU, M.V.; LUSEBETTENS, M.V. (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. **PNAS**, v. 85, pp. 5536-5540.

VAUCHERET, H. et al. (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal of Cell Science**, n. 114, pp. 3083-3091.

VENDRUSCOLO, E.C.G. (2003) Silenciamento gênico e transgênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, pp. 8-13.

WANG, G.; DIXON, R.A. (2009) Heterodimeric geranyl(geranyl)diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. **PNAS**, v. 106, n. 24, pp. 9914-9919.

WANKE, M.; SKORUPINSKA-TUDEK, K.; SWIEZEWSKA, E. (2001) Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, pp. 663-672.

WEIGEL, D. & GLAZEBROOK, J. (2002) *Arabidopsis – A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

WONG, D.W.S. (1996) **The ABCs of Gene Cloning**. New York: Chapman & Hall.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, pp. 75-85.

YANOFSKY, M.F.; MA, H.; BOWMAN, J.L.; DREWS, G.N.; FELDMANN, K.A.; MEYEROWITZ, E.M. (1990) The protein encoded by *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. **Nature**, v. 346, pp. 35-39.

YUAN, J.S.; REED, A.; CHENG, F.; STEWART-JUNIOR, C.N. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. **BioMed Central Bioinformatics**, 7, 86.

ZHU, X. et al. (1997a) Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*. **Plant Cell Physiol.**, v. 38, n. 3, pp. 357-361.

ZHU, X. et al. (1997b) Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. **Plant Molecular Biology**, v. 35, n. 3, pp. 331-341.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Sequência completa do gene *GGR* de *Arabidopsis thaliana*, acesso NC_003075.7 (NCBI)

GGCTGAACCCAATTTTACTAAATTATCATTATCTCAAACACAACAAGGATAGATC
ATCCTCATAGGCGATGTTGTTTAGTGGTTCAGCGATCCCATTAAGCAGCTTCTGCT
CTCTTCCGGAGAAACCCACACTCTTCCATGAAACTCTCTCCCGCTGCAATCCGA
TCTTCATCCTCATCTGCCCCGGGGTCGTTGAACTTCGATCTGAGGACGTATTGGAC
GACTCTGATCACCGAGATCAACCAGAAGCTGGATGAGGCCATAACCGGTCAAGCA
CCCTGCGGGGATCTACGAGGCTATGAGATACTCTGTACTCGCACAAGGCGCCAAG
CGTGCCCTCCTGTGATGTGTGTGGCGGCCTGCGAGCTCTTCGGTGGCGATCGCCT
CGCCGCTTTCCCCACCGCCTGTGCCCTAGAAATGGTGAGATAGATTCCACTCTCTC
TCGCCTTGTAATCTCAATTTCCGCCGTTAGTGTGTTGATATGAGTGAGTAAGAAGAA
GAAATAGAAAGTCTTTGTTGTTGTTGTTGAGAGATGTGTGTGTTGTATCTAATAAT
GGAATGAATCAGGTGCACGCGGCTTCGTTGATACACGACGACCTCCCCTGTATGG
ACGACGATCCTGTGCGCAGAGGAAAGCCATCTAACCACACTGTCTACGGCTCTGG
CATGGCCATTCTCGCCGGTGACGCCCTTCCCCTCGCCTTCCAGCACATTGTCT
CCCACACGCCTCCTGACCTTGTTCCCCGAGCCACCATCCTCAGACTCATCACTGAG
ATTGCCCGCACTGTCCGGCTCCACTGGTATGGCTGCAGGCCAGTACGTCGACCTTG
AAGGAGGTCCCTTTCCTCTTTCCTTTGTTTCAGGAGAAGAAATTCGGAGCCATGGG
TGAATGCTCTGCCGTGTGCGGTGGCCTATTGGGCGGTGCCACTGAGGATGAGCTC
CAGAGTCTCCGAAGGTACGGGAGAGCCGTCGGGATGCTGTATCAGGTGGTCGAT
GACATCACCGAGGACAAGAAGAAGAGCTATGATGGTGGAGCAGAGAAGGGAAT
GATGGAAATGGCGGAAGAGCTCAAGGAGAAGGCGAAGAAGGAGCTTCAAGTGTT
TGACAACAAGTATGGAGGAGGAGACACACTTGTTCCTCTCTACACCTTCGTTGAC
TACGCTGCTCATCGACATTTTCTTCTTCCCCTCTGATTTTGGGCCCTCTTTTACATT
TGGGCCCTTCCCTCGCTATACGAAATTAGGCCCTGTAATGGACTGTGTATCGTTCAT
TTTTAGCCCAGAGCTTCTTCGCTTGACCATTCTTTCGCTACCACCTGTCATTATC
ATTGTTTTTTTTTTGTGTGCGCCATGTCAAATCATTAGTTACTACATGTACTTTT
AACCAAATTTATAGCAATCTACTATGTATGTATTTATTTA

ANEXO 2

Sequência completa do gene *GGPPS2* de *Arabidopsis thaliana*, acesso NC_003071.7 (NCBI)

ATAGAAATTTTGATTTGATTTTGTATGAAAAATGGAACCACAAATCTTTTTCTCTA
TCTCTCACTCTTCATTCTCTCCCTAAACTTCTTCTTCACGAATCTTAAACCAAGGCT
AGTCCGCCTCTTCCAGCCTTCTTTAGAATCTCGTGTCAAGACCGCTCTTTTATCCC
GAAAGGAAGTAGCCGCGTTTCTTGATTCTCCATTGTGCGAAGACGAAGAAGGCGA
AGAAAGAGAAGAGGAAGAAGAAGGAGGTATCGTTTCAAATGCCAACTTTACGTT
TGAGTTTGATCCATACATGATGAGCAAAGCCGAATCAGTGAACAAAGCTCTAGA
AGAAGCAATTCCAGTCGGAGAGCCACTCAAGATTCATGAAGCCATGCGATACGC
GATTCTTGCGGCTGGAAAACGTGTTAGGCCAATACTCTGCCTTGCTTCTTGCGAGC
TAGTAGGTGGCCAAGAAAATGCGGCAATGCCCGCCGCTTGTGCGGTTGAGATGAT
CCACACGATGTCTCTAATCAAAGACGATTTGCCTTGTATGGACAACGACGATTTG
CGTCGTGGAAAGCCCACGACGCACAAAGTCTACGGCGAAGGAGTTGCCATTCTCT
CTGGTGGGGCTCTTGTCTCTTGCCTTTGAGCACATGACCACCGCTGAAATATCC

TCGGAGAGAATGGTTTGGGCGGTGAGAGAATTGGCTAGGTCTATTGGGACAAGA
GGTTTAGTCGCGGGACAAGCGATGGATATAAGCAGTGAAGGTTTGGACTTAAAC
GAGGTCGGATTAGAGCATTGGAGTTTATCCATGTTTCATAAAACCGCGGTTTTGTT
GGAAACTGCCGCGGTTCTTGGCGCCATAATTGGTGGTGGATCTGATGAAGAGATT
GAAAGTGTGAGAAAGTTTGCAAGGTGCATTGGATTGTTGTTTCAGGTGGTGGATG
ATATTTTGGACGAGACGAAGTCGTCGGAGGAATTGGGAAAAACCGCCGGGAAAG
ATCAGCTCGCCGAAAGCTAACGTATCCAAAGTTGATAGGGTTGGAGAAATCGA
AAGAATTTGTTAAGAGATTGACGAAAGATGCACGGCAACATCTTCAAGGGTTTAG
TTCTGAAAAGGTTGCTCCTTTAGTAGCTCTTACTACTTTTATTGCTAATAGAAATA
AGTGATTATATATTTGTTTTGTTTGTGTGTGTTGGGTTTATGTATACATGCTAAAG
TAGTGTGTTCCCTTATTTTAAAGTGAACCACATTTTAAAGATGTTTATTAATGAAT
ATTTAAAATGTACATAATTTTT

ANEXO 3

Sequência completa do gene *GGPPS6* de *Arabidopsis thaliana*, acesso NC_003070.9 (NCBI)

TTGTATTAGAGGCTAATGAAGAACTTTACATTATTTTGGTGCTACTATTAGATAT
AAACACAACCTCAATAAAGTTTACTTGGCGCTGTAACATAATCATCATGCGGCCGCG
TTACAGTCTGATTCTGTCTGCAATGCGGCTAATACGACCGTCCAACCGCCGTCTA
AGTTCGATCGCAAGCTCCGACTCTGAGTTCATTTTCATACATGAAGAATAAGGCTA
AGTCCATCAACAAAGCACTAGACAATTCAATTCCTCTTTGCAACAATTTTGTTCCCT
CTTTGGGAGCCAGTACTCGAGGTTCAAAAGCTATGAGGTACACGCTTCTCCAG
GCGGAAAACGAGTAAGGCCAATGCTCTGTTTGGTCGCTTGCAGCTCGTAGGTGG
CCAAGAGTCAACCGCAATGCCAGCAGCCTGTGCGGTTGAGATGATTCACGCAGC
GTCGCTCATCCTAGACGACCTTCCTTGTATGGATGACGACAGCCTCCGCCGTGGA
AAACCCACCAACCATAAAGTTTTTGGCGAGAAAACATCCATCTTGGCCTCTAATG
CGCTCAGGTCTTTGGCCGTCAAGCAGACATTGGCATCGACCTCATTGGGGGTGAC
TTCAGAGAGGGTTCTTCGGGCTGTTTCAGGAGATGGCGAGAGCTGTTGGGACAGA
GGGACTTGTGGCAGGCCAAGCAGCGGATTTGGCCGGAGAAAGGATGAGTTTTAA
GAACGAAGACGACGAATTGAGATATCTTGAAGTTGATGCATGTTTCATAAAACCGCG
GTTTTGGTTGAAGCTGCGGCTGTTGTGGGAGCTATAATGGGAGGTGGGTCTGATG
AAGAGATTGAGAGGCTTAAGAGCTACGCGAGGTGCGTTGGACTGATGTTTCAGGT
GATGGATGATGTACTCGATGAGACCAAGTCTTCCGAGGAGCTTGGGAAAACCTGCC
GGTAAAGATTTGATCACCGGAAAGCTGACGTATCCGAAGGTGATGGGTGTGGAC
AATGCGAGAGAATATGCAAAGAGGTTGAACAGAGAAGCGCAGGAACATCTTCAG
GGGTTTGAATCTGACAAGGTGGTTCCTTTGTTGTCTCTCGCTGATTATATTGTCAA
GAGACAAAACCTGACTGTTGCACCATAGCTTAATAATCAATGAAAAGCATCAAAG
ATGCAAAGCGAGAAAGTTATTTGTTTGTTTTTCTTTTAAACGAGGAAAAAAGTG
GTTTGTAAACATGTTTCGATTTAGCTAACCAAATTTGCATAAATATTACAAT