FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLANTAS

- **ESTUDO DO "PEPPER RINGSPOT VIRUS" COMO VECTOR DE EXPRESSÃO**
- **EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EM *SOLANUM TUBEROSUM* L. POR TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Dissertação apresentada à **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto** para obtenção do grau de Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

Ana Raquel Santos Figueiredo

Porto, 2003

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLANTAS

- **ESTUDO DO "PEPPER RINGSPOT VIRUS" COMO VECTOR DE EXPRESSÃO**
- **EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE EM *SOLANUM TUBEROSUM* L. POR TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Dissertação apresentada à **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto** para obtenção do grau de Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

Ana Raquel Santos Figueiredo

Porto, 2003

Ana Raquel Santos Figueiredo

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM PLANTAS

Estudo do "Pepper Ringspot Virus" como vector de expressão

Expressão da proteína verde fluorescente em *Solanum tuberosum* L. por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Dissertação apresentada à **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto** para obtenção do grau de Mestre em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal

Sob orientação

da Doutora Susana Pereira

e do Prof. Doutor José Pissarra

2003

AGRADECIMENTOS

À Doutora Susana Pereira pela orientação, entusiasmo e ensinamentos transmitidos no percurso da investigação.

Ao Professor Doutor José Pissarra pelo auxílio nos trabalhos de microscopia.

A ambos a oportunidade de realização deste trabalho e a confiança nele depositada.

Ao Mestre Júlio Borlido pelo planeamento, colaboração e aconselhamento na execução de todo o trabalho relativo ao desenvolvimento de *Solanum tuberosum* L. transgénicas.

À doutoranda Patrícia Duarte pelos ensinamentos iniciais das técnicas de biologia molecular e pelo provimento de literatura essencial a este trabalho.

À mestranda Rita Meireles, pela companhia e apoio nos trabalhos relativos aos Tobravírus.

Ao Doutor Luís Gustavo Pereira pela participação na discussão do planeamento das estratégias adoptadas no trabalho relativo aos Tobravírus.

Aos colegas de Mestrado, Isabel Fernandes, Iolanda Costa, Sabina Gomes e José Carlos Silva por permitirem um ambiente propício ao estudo em grupo.

À Mestre Natália Coelho, Dr. Paulo Oliveira e doutoranda Elsa Leitão que sempre disponibilizaram ajuda nalguns trabalhos.

À Drª Goreti Santos por me facilitar o seu relatório de estágio, bem como ao Mestre Júlio Borlido e à Mestre Natália Coelho as dissertações de Mestrado, essenciais à organização e redacção desta dissertação.

À doutoranda Patrícia Duarte, doutoranda Elsa Leitão e Drª Ana Confraria pela leitura de parte desta dissertação e auxílio no arranjo das figuras.

À D. Isabel Guimarães pelos comentários e conselhos na realização dos meios de cultura.

Ao Dr. José Manuel Almeida por disponibilizar o artigo necessário à realização do PCR de DNA genómico.

Ao Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e à Unidade "Functional Plant Biology" do Laboratório Associado – Instituto de Biologia Molecular e Celular por proporcionarem as condições necessárias à realização deste trabalho.

Às minhas irmãs por criarem um ambiente "de casa" aqui no Porto e finalmente aos meus pais por mim.

RESUMO

A capacidade para manipular genes pode permitir alterações racionais e deliberadas da expressão de proteínas nas plantas, o que é de extrema importância para a investigação molecular e bioquímica. Deste modo o desenvolvimento de métodos eficientes para introduzir sequências estranhas em plantas é primordial para o conhecimento e controlo da expressão génica.

As sequências estranhas podem ser expressas em plantas tanto através de uma inserção permanente como por expressão transitória mediada por vectores virais. Muitos vírus vegetais multiplicam-se em grande quantidade nas plantas, podendo levar a concomitantes níveis elevados de expressão de sequências não virais. Os genomas de vírus vegetais são geralmente de tamanho reduzido o que torna a sua manipulação possível *in vitro*. Particularmente, os vectores tobravirais infectam largas áreas de células adjacentes mas induzem sintomas muito suaves. Estes vírus possuem um genoma constituído por duas moléculas de RNA de cadeia simples positivas. O RNA1 codifica as proteínas virais responsáveis pela replicação e movimento do vírus no interior das plantas. A infecção só depende dele. O RNA2 codifica a proteína da cápsula (PC) do vírus e por vezes alguma outra proteína não estrutural. Sendo assim, pode ser manipulado com o intuito de expressar sequências não virais. Por vezes, a sequência estranha é inserida como um gene adicional associado a um promotor viral duplicado. A caracterização dos promotores do "Pepper Ringspot Virus" (PepRSV) não está documentada. Neste trabalho foi abordada a identificação de um possível promotor como a região dos 155 bp a montante da grelha de leitura da proteína da cápsula do RNA2, visto apresentar um motivo GCAUA e uma estrutura secundária altamente conservada tal como documentado para os promotores das proteínas da cápsula dos Tobravírus. Esta estrutura incluí-se nas estruturas secundárias mais estáveis adoptadas pelo RNA2 do PepRSV em simulações em computador. Neste trabalho também se descreve uma estrutura secundária adicional, para além da descrita na literatura, em sequências de vários tamanhos a montante do codão ATG da grelha de leitura da PC.

Com o intuito de permitir a fácil clonagem de sequências estranhas no RNA2 conseguiu-se a inserção do promotor da PC no plasmídio pUC19 e a integração de um local de restrição múltipla do plasmídio pBluescript II SK (*NOVAGENE*) a jusante da grelha de leitura da PC. O RNA2 quimérico foi desenhado de modo a que grelha de leitura da proteína heteróloga fique a jusante da PC o que permite uma melhor expressão daquela. A confirmação da capacidade de expressão de proteínas heterólogas por parte do PepRSV quimérico foi inviabilizada pela indisponibilidade de RNA1, o agente infeccioso do vírus.

Para testar a funcionalidade da sequência a montante da ORF da PC seria necessário recorrer à fusão de genes repórter com este promotor. Para o efeito foi analisada a viabilidade da GFP citosólica, que vem associada ao promotor 35S do

pCAMBIA 1302, como gene repórter. Trabalhos anteriores (Coelho, 2000) indiciavam que este mutante de GFP poderia apresentar toxicidade para as plantas uma vez que mutantes de tabaco transformadas apresentavam um fraco crescimento.

No presente trabalho, avaliou-se o efeito do mutante de GFP citosólico num outro modelo vegetal, *Solanum tuberosum* L. Recorreu-se à transformação com pCAMBIA 1302, plasmídio no qual a GFP vem inserida, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. O pCAMBIA 1302 possui um gene bacteriano quimérico de resistência ao antibiótico higromicina B que foi alterado no sentido de se expressar em plantas e um local de restrição múltipla a jusante de um promotor específico para as plantas – CaMV35S – onde se podem introduzir as sequências estranhas, neste caso a GFP.

Os métodos de transformação com *A. tumefaciens* experimentados para a transformação de *Solanum tuberosum* L. baseiam-se na cocultivação de folha e de segmentos de caule com agrobactérias. Entretanto, foi desenvolvida toda a metodologia de cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L., nomeadamente a tuberização *in vitro* que pode suprimir a dependência da sazonalidade desta cultura.

Foram experimentados vários meios até se seleccionar aqueles que promovessem a regeneração de plântulas a partir de gomos axilares e discos foliares; produção de microtubérculos e subsequente armazenamento. Após isto, partiu-se para a transformação de gomos axilares e discos foliares tendo sido necessário testar várias concentrações de antibiótico compactíveis com uma regeneração aceitável de plântulas. A transformação foi comprovada por iluminação UV, microscopia de fluorescência e PCR de DNA genómico. No entanto, verificou-se que as plantas transformadas com GFP apresentavam um desenvolvimento reduzido culminando na senescência e morte das plantas produzidas. Estes resultados apoiam a hipótese da toxicidade deste mutante de GFP já verificada para o tabaco. Assim, pode-se sugerir que a GFP utilizada não é o gene repórter ideal para o desenvolvimento do vector viral com base no promotor da PC proposto neste trabalho.

ABSTRACT

Efficient methods for introducing foreign sequences into plants are important for understanding and controlling plant gene expression. The ability to manipulate genes could lead to rational, deliberate al.terations of the proteins expression of plants for molecular and biochemical research.

Foreign sequences can be expressed in plants either by permanent insertion into the genome or by transient expression using virus-based vectors. Many plant viruses multiply to high levels in plants, leading to concomitantly high levels of nonviral sequences expression; plant virus genomes often are small in size making then possible to manipulate *in vitro*. Particularly, Tobravirus vectors infect large areas of adjacent cells but induce very mild symptoms. These virus have two positive-sense, single-stranded genomic RNAs. RNA1 encodes the viral proteins that are responsible for replication and movement of virus in plants. Infection only depends on it. RNA2 encodes the virus coat protein (CP) and sometimes one or more other nonstructural proteins. So, it could be engineered to express non-viral sequences. Often the foreign sequence is inserted as an additional gene linked to a duplicated viral promoter. Characterization of Pepper Ringspot Virus (PepRSV) promoters, Tobravirus specie used here, had not been undertaken. In this work, it has been characterised the 155 bp region upstream the coat protein open reading frame of PepRSV that presents a GCAUA motif and a strongly-conserved secondary structural element as other tobraviral coat protein promoters. This structure is included among the most stable computer-generated secondary structures adopted by PepRSV RNA2. Here has al.so been described an additional secondary structure, not described in literature, conserved in fragments of different length upstream the CP open reading frame ATG codon.

To facilitate the cloning of heterologue sequences in RNA2 a CP promoter insertion in pUC19 and the pBluescript II SK (*NOVAGENE*) polilinker integration upstream CP open reading frame have been achieved. Quimeric RNA2 has been designed in such a way that heterologue protein open reading frame came downstream of that of CP, which enhance its expression. Heterologue proteins expression *in vivo* has not been undertaken due to problems in obtaining an infectious RNA1 clone.

The PC promoter:GFP construct has been done to test the activity of PC upstream sequence as PepRSV promoter. The reduced growth of tobacco plants transformed with pCAMBIA 1302 has been shown by previous work (Coelho, 2000). It has been suggested that this situation was due to GFP toxicity. GFP toxicity appearing in other model plant, potato, supports this hypothesis.

In this work, *A. tumefaciens* transformation methods experienced for *Solanum tuberosum* L. rely on the cocultivation of leaf and stem segment explants with agrobacteria. pCAMBIA 1302, the transformation vector used in this work, has been

engineered to have a chimeric gene for bacterial antibiotic resistance that had been engineered to express in plants – higomicin B – and a multiple cloning site downstream a plant-specific promoter – CaMV35S – for the introduction of foreign sequences. It contains, additionally, a reporter gene – green fluorescent protein (GFP) gene – that al.lows, between others things, a positive corroboration of *A. tumefaciens* transformation.

In parallel, a procedure for *in vitro* tuberisation that could mitigate the seasonal dependence of *Solanum tuberosum* L. has been used.

Several culture media have been evaluated until those that enhance plant regeneration from axillary buds or foliar discs, microtubers production or subsequent storage were found. After that, it has been undertaken *A. tumefaciens* mediated transformation of axillary buds and foliar discs. It has been necessary to test several antibiotic concentrations to get an acceptable plant regeneration. UV luminescence, fluorescence microscopy and genomic DNA PCR have proved *Solanum tuberosum* transformation.

ÍNDICE

1 **CAPÍTULO 1 – Estudo do "Pepper Ringspot Virus" como vector de expressão de proteínas heterólogas em plantas**

2 **ABREVIATURAS**

4 **INTRODUÇÃO**

5 OS TOBRAVIRUS

BIOLOGIA MOLECULAR DOS TOBRAVIRUS

8 RNAs SUBGENÓMICOS

13 OS PROMOTORES VIRAIS SUBGENÓMICOS

15 PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA DOS TOBRAVIRUS

RECONHECIMENTO DO PROMOTOR SUBGENÓMICO PELO COMPLEXO REPLICASE

19 SÍNTESE DA CADEIA NEGATIVA

25 USO DOS VÍRUS COMO VECTORES

27 MATERIAL E MÉTODOS

28 REACÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA

OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

CONSTRUÇÃO DE INICIADORES

29 CONFIRMAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE REACÇÃO DE LIGAÇÃO

SELECÇÃO DE COLÓNIAS BACTERIANAS RECOMBINANTES

PCR

31 PCR DE SEQUÊNCIAS LONGAS

32 "POLISHING" DE PRODUTOS DE PCR

VISUALIZAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE

33 EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSE

34 PURIFICAÇÃO DE DNA POR PRECIPITAÇÃO COM ISOPROPANOL

CONSTRUÇÃO DE CLONES

MONTAGEM DA CONSTRUÇÃO DO PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA DO RNA 2 DO PepRSV:CARDOSINA A

35 MONTAGEM DA CONSTRUÇÂO DO LOCAL DE RESTRIÇÃO MÚLTIPLA DO pSK:mgfp5:PROMOTOR DA PC DO RNA 2 DO PepRSV

CULTURA DE *ESCHERICHIA COLI*

36 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

37 ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE RECOMBINANTES

PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIO

38 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO

"COLONY BLOTTING" E HIBRIDAÇÃO

42 RESULTADOS E DISCUSSÃO

43 CONSTRUÇÃO DE CLONES

DESENHO DO PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA

49 MONTAGEM DA CONSTRUÇÃO DO PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA DO RNA 2 DO PepRSV:CARDOSINA A

50 MONTAGEM DA CONSTRUÇÃO DO LOCAL DE RESTRIÇÃO MÚLTIPLA DO pSK:mgfp5:PROMOTOR DA PC DO RNA 2 DO PepRSV

54 BIBLIOGRAFIA

58 CAPÍTULO 2 – Expressão da proteína fluorescente verde em *Solanum tuberosum* L. utilizando como vector de transformação *Agrobacterium tumefaciens*

59 ABREVIATURAS

60 INTRODUÇÃO

61 A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

62 MELHORAMENTO DA GFP COMO INSTRUMENTO BIOTECNOLÓGICO

63 DIRECCIONAMENTO SUBCELULAR DA GFP

64 MELHORAMENTO DA MATURAÇÃO DA GFP

65 MODIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA GFP

66 VISUALIZAÇÃO (IMAGING) DA GFP EM CÉLULAS VEGETAIS

67 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM BATATEIRA

68 ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DA BATATEIRA

69 TRANSFORMAÇÃO DE SOLANUM TUBEROSUM I. POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

74 CULTURAS IN VITRO

77 **MATERIAL E MÉTODOS**

78 INDUÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE TUBÉRCULOS

DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES PROVENIENTES DA ESTUFA

INDUÇÃO *IN VITRO* DE MICROTUBÉRCULOS DE *SOLANUM TUBEROSUM* L.

79 ARMAZENAMENTO DE MICROTUBÉRCULOS FORMADOS *IN VITRO*

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE GOMOS AXILARES

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

80 TRANSFERÊNCIA DE PLÂNTULAS *IN VITRO* PARA TERRA

CULTURA E ARMAZENAMENTO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

81 TRANSFORMAÇÃO DE AGROBACTÉRIAS LBA4404 ELECTROMAX
82 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE al.CALINA PARA AGROBACTÉRIAS LBA4404 TRANSFORMADAS COM pCAMBIA 1302
83 EXTRACÇÃO DO pCAMBIA 1302 POR FENOL:CLOROFÓRMIO E LAVAGEM COM ETANOL
TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404 DE GOMOS AXILARES DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. COM pCAMBIA 1302
84 TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404 DE DISCOS FOLIARES DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. COM pCAMBIA 1302
85 ANÁLISES BIOQUÍMICAS PARA A CONFIRMAÇÃO DA TRANSGENIA
EXTRACÇÃO DE RNA TOTAL E DE DNA GENÓMICO
86 ANÁLISE DE DNA GENÓMICO
ANÁLISE DE RNA TOTAL
87 OBSERVAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

88 RESULTADOS E DISCUSSÃO
89 INDUÇÃO *IN VITRO* DE MICROTUBÉRCULOS DE *SOLANUM TUBEROSUM* L.
91 INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE GOMOS AXILARES
92 TRANSFORMAÇÃO DE GOMOS AXILARES DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. COM pCAMBIA 1302 MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404
95 INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES
96 TRANSFORMAÇÃO DE DISCOS FOLIARES DE *SOLANUM TUBEROSUM* L. COM pCAMBIA 1302 MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404
102 CULTURA E ARMAZENAMENTO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*
103 TRANSFORMAÇÃO DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* LBA4404 ELECTROMAX
104 PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE al.CALINA PARA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* LBA4404 ELECTROMAX TRANSFORMADAS COM pCAMBIA 1302

108 BIBLIOGRAFIA

112 CAPÍTULO 3 - Conclusão

113 PERSPECTIVAS FUTURAS

114 CONCLUSÃO

CAPÍTULO 1

Estudo do "Pepper Ringspot Virus" como vector de expressão de proteinas heterólogas em plantas

ABREVIATURAS

A – adenina

AMV - vírus do mosaico da luzerna

BMV - vírus do mosaico brómico

bp – par de base

BYDV – "barley yellow dwarf virus"

CMV – "cucumber mosaic virus"

DdRp - RNA polimerase dependente de DNA

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

EF - factores de alongamento implicados na tradução

g – aceleração devido à gravidade

G – guanina

GFP- proteína verde fluorescente

gRNA – RNA genómico

GS – glutamina sintetase

Kb – kilobase

LB - meio *Luria Broth Base* da *GIBCO BRL – Life Technologies*^{TM}

mgfp5 – GFP modificada (ver *INTRODUÇÃO* do *CAPÍTULO 2)*

MHV – "mouse hepatitis coronavirus"

min - minuto

ON – "over-night"

ORF - grelha de leitura

PC - proteína da cápsula do Tobravírus

PCR – reacção de polimerização em cadeia

PEBV - "Pea early-browning virus"

PepRSV – "Pepper Ringspot virus"

PIPES - piperazine-N,N'-bis[2-ethane-sulfonic acid

pSK – plasmídio pBluescript II SK (*NOVAGEN*)

p/v – peso/volume

PVX – "potato virus X"

RCNMV – "red clover necrotic mosaic virus"

RdRp - RNApolimerase dependente de RNA

RT – temperatura ambiente

sec - segundo

sgRNA – RNA subgenómico

SDS – dodecil sulfato de sódio

T - timina

TAE – tampão de corrida de electroforese

TCV – "Turnip crinkle virus"

Tm – temperatura de emparelhamento

TMV - vírus do mosaico do tabaco

Tris - Hidroximetilaminometano

3'UTR - região não codificante na extremidade 3'

TRV - "Tobacco rattle virus"

TYMV - vírus do mosaico amarelo do nabo

U – uracilo

UV – ultravioleta

v/v – volume/volume

INTRODUÇÃO

OS TOBRAVÍRUS

O vírus do anel do pimenteiro, PepRSV ("pepper ringspot virus"), é uma das três espécies pertencentes ao género TOBRAvírus, sendo as outras duas o TRV ("Tobacco rattle virus") e o PEBV ("Pea early-browning virus"). Estes vírus utilizam como vector de infecção, no campo, nemátodes. Alojam-se especificamente nas células bocais destes vermes e a partir daqui infectam as plantas (para citações ver MacFarlane, 1999).

Os sintomas das plantas afectadas pelo PepRSV são, como o próprio nome indica, manchas amareladas em forma de anéis nas folhas e frutos, apresentando-se as folhas enrugadas. Presumivelmente resultam do facto das células passarem a produzir proteínas víricas em detrimento das proteínas vegetais. A nível celular pode-se observar que as cápsulas víricas se associam às mitocôndrias das células eucarióticas embora se desconheça o significado deste fenómeno (ver figura 1).

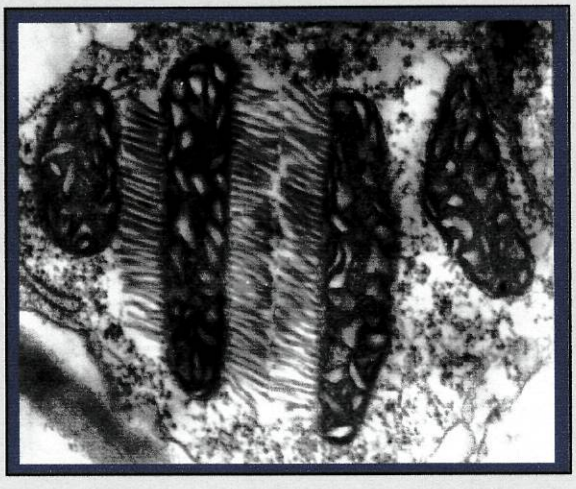


Figura 1 – Associação das cápsulas víricas às mitocôndrias de células de pimenteiro (*Capsicum annum*). Fotografia cedida por Doutor Luís Gustavo Pereira.

O PepRSV apenas foi descrito no Brasil. Provoca doenças em pimenteiro, tomate e alcachofra. O PEBV infecta principalmente legumes em regiões do Norte da Europa e do Norte de África. O TRV goza de maior ubiquidade quer a nível da sua distribuição geográfica quer a nível da sua capacidade de infecção causando danos económicos consideráveis em culturas de batata, tabaco e bulbosas ornamentais (MacFarlane, 1999).

A transmissão dos Tobravírus entre plantas é executada por nemátodos do solo (para citações ver MacFarlane, 1999). A relação Tobravírus/nemátodo apresenta um grau considerável de especificidade.

BIOLOGIA MOLECULAR DOS TOBRAVíRUS

O genoma dos Tobravírus é compostos por duas moléculas de RNA, RNA1 e RNA2, de cadeia simples. Os RNAs dos Tobravírus são de sentido positivo, ou seja, directamente traduzidos ou duplicados noutros RNAs virais, sem intervenção de DNA. O RNA1 e o RNA2

são encapsulados separadamente em partículas com forma de bastonete (MacFarlane, 1999).

Uma particularidade dos Tobravírus é o facto de causarem dois tipos de infecção. Num tipo de infecção intervém apenas o RNA1, a molécula maior do genoma vírico. O RNA1, de forma independente, multiplica-se e distribui-se por toda a planta. Só não consegue produzir partículas víricas visto a proteína da cápsula ser codificada por um gene do RNA2, a molécula mais pequena. No segundo tipo de infecção participam os dois RNAs virícos que são encapsulados, embora, separadamente.

O comprimento do RNA genómico maior (RNA1) dos Tobravírus varia entre 6.8-7.0 Kb. O RNA genómico menor (RNA2) varia consideravelmente de tamanho, entre 1.8 e 3.9 KB. Estudos de hibridização demonstram que as moléculas de RNA2 não partilham sequências homólogas de tamanho considerável entre os subgrupos de Tobravírus. Esta variabilidade apoia a hipótese das moléculas de RNA2 tobravirais não derivarem da mesma origem filogenética (para citações ver Goulden *et al.*, 1990). No entanto, Goulden *et al.* (1990) defendem um ancestral comum pelo menos para o gene da proteína da cápsula dos Tobravírus ao demonstrar uma homologia de 35 a 50% entre as ORFs desta proteína nos três membros representativos do grupo.

Atipicamente para os RNAs virais, o RNA2 dos Tobravírus não codifica directamente nenhum produto. Apesar de possuir a ORF da proteína da cápsula, a 5', esta proteína é produzida por um sgRNA a que falta parte substancial da sequência do RNA2 (Goulden *et al.*, 1990). O intervalo de variação de tamanhos do RNA2 deve-se em parte a uma sequência 3´terminal homóloga ao RNA1. A homologia é muito próxima dos 100% com o RNA1 do mesmo sub-grupo sendo importante para a replicação dos RNAs. No entanto, essa homologia não necessita ser absoluta (Goulden *et al.*, 1990).

A molécula de RNA1 apresenta um tamanho e organização génica semelhante nas três espécies de Tobravírus. A sequência de nucleótidos dos diferentes RNA1 assemelha-se apenas cerca de 58-65% (MacFarlane, 1999).

Os RNAs dos Tobravírus caracterizam-se por possuir uma extremidade 5' "capped" e incluírem uma estrutura terciária tipo tRNA na extremidade 3' (Goulden *et al.*, 1990).

No RNA1 reconhecem-se três genes: gene "replicase", gene 1a e 1b. O gene mais próximo da extremidade 5´ codifica uma proteína que possuí motivos tanto associados com a actividade de metiltransferase como de helicase e proteína de ligação a nucleótidos (conjuntamente). Na mesma grelha de leitura e imediatamente a jusante do gene da helicase surge um gene com motivos próprios de RNApolimerase dependente de RNA (RdRp). O termo replicase é utilizado para distinguir o complexo proteico composto por proteínas virais e celulares que dirigem a síntese de RNA viral da subunidade que cataliza a formação das reacções fosfodiester, a RdRp (Sivakumaran *et al.*, 2000). Experimentalmente demonstrou-se que, em TRV, este gene era traduzido por readthrough do codão de terminação do gene da helicase (para citações ver MacFarlane, 1999). A

paragem da tradução da helicase no codão de terminação UGA podia ser suprimida por tRNAs cloroplasmáticos e citoplasmáticos que mediavam a incorporação de resíduos de triptofano ou cisteína nesta posição (para citações ver MacFarlane, 1999).

O gene 1a situa-se a 3' do gene "replicase" e apresenta homologia com genes que codificam proteínas de movimento entre células, característicos do vírus do mosaico do tabaco - TMV (MacFarlane, 1999). O gene mais próximo da extremidade 3', 1b, codifica uma proteína cuja extremidade N - terminal é rica em cisteína. Esta proteína apresenta homologia com proteínas implicadas na expressão génica e na transmissão por sementes (para citações ver MacFarlane, 1999).

Os codões de iniciação do gene 1b do PepRSV e do PEBV podem surgir a montante do codão de terminação do gene 1a (ver figura 2). Esta sobreposição é precedida por seis nucleótidos de adenina. Este facto levanta a hipótese de a proteína 1b em certas circunstâncias ser expressa como uma proteína de fusão com a parte C - terminal da proteína 1a, correspondente à extremidade 3' deste gene (MacFarlane, 1999).

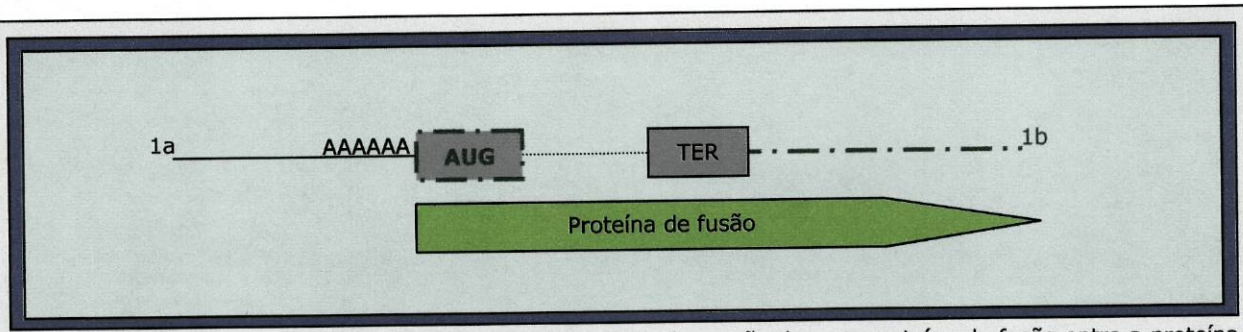


Figura 2 - Representação esquemática da possibilidade de formação de uma proteína de fusão entre a proteína 1b e a parte C - terminal da proteína 1a do RNA1.

O RNA2 do TRV e do PepRSV é recombinante e apresenta uma grande variabilidade entre estirpes e espécies de Tobravírus. Cerca de 1 Kb da sua região 3´ é completa ou fortemente idêntica aos genes 1a e 1b do RNA1 (MacFarlane, 1999). Esta região é bastante conservada o que reflecte a sua função na duplicação do RNA viral. É capaz de adoptar uma estrutura tipo tRNA com duas ansas e uma pseudoansa. No entanto, o RNA2 do TRV pode ser apenas adenilado e não aminoacetilado (MacFarlane, 1999). A extremidade não codificante a 5' varia consideravelmente em tamanho entre os vários Tobravírus e diferentes estirpes. Esta região assume uma estrutura tipo tRNA implicada também na duplicação eficiente do RNA2.

A maioria dos RNA2 dos Tobravírus codifica uma proteína envolvida na construção da cápsula do vírus (MacFarlane, 1999). Apesar do gene PC ser o mais próximo da extremidade 5' do RNA2 não é traduzido directamente a partir do RNA genómico mas sim de um RNA subgenómico (sgRNA). Esta estratégia torna-se necessária na medida em que a região não codificante 5' tem cerca de sete codões de iniciação da tradução antes do

paragem da tradução da helicase no codão de terminação UGA podia ser suprimida por tRNAs cloroplasmáticos e citoplasmáticos que mediavam a incorporação de resíduos de triptofano ou cisteína nesta posição (para citações ver MacFarlane, 1999).

O gene 1a situa-se a 3' do gene "replicase" e apresenta homologia com genes que codificam proteínas de movimento entre células, característicos do vírus do mosaico do tabaco - TMV (MacFarlane, 1999). O gene mais próximo da extremidade 3', 1b, codifica uma proteína cuja extremidade N - terminal é rica em cisteína. Esta proteína apresenta homologia com proteínas implicadas na expressão génica e na transmissão por sementes (para citações ver MacFarlane, 1999).

Os codões de iniciação do gene 1b do PepRSV e do PEBV podem surgir a montante do codão de terminação do gene 1a (ver figura 2). Esta sobreposição é precedida por seis nucleótidos de adenina. Este facto levanta a hipótese de a proteína 1b em certas circunstâncias ser expressa como uma proteína de fusão com a parte C - terminal da proteína 1a, correspondente à extremidade 3' deste gene (MacFarlane, 1999).

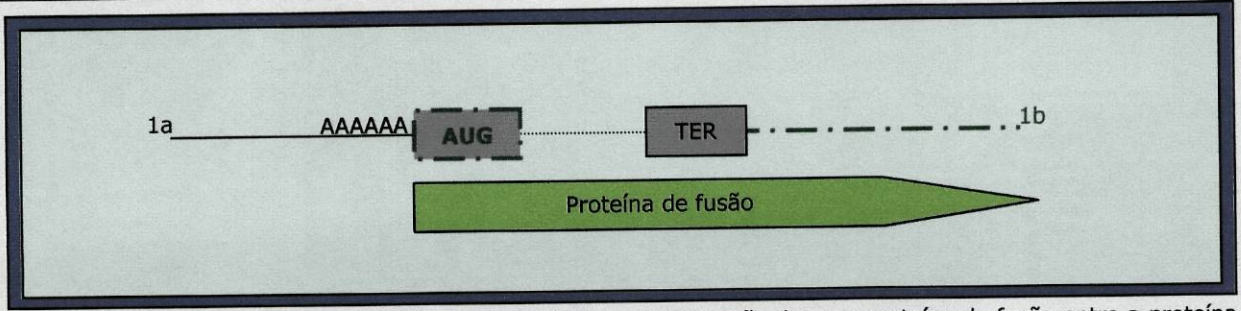


Figura 2 - Representação esquemática da possibilidade de formação de uma proteína de fusão entre a proteína 1b e a parte C - terminal da proteína 1a do RNA1.

O RNA2 do TRV e do PepRSV é recombinante e apresenta uma grande variabilidade entre estirpes e espécies de Tobravírus. Cerca de 1 Kb da sua região 3´ é completa ou fortemente idêntica aos genes 1a e 1b do RNA1 (MacFarlane, 1999). Esta região é bastante conservada o que reflecte a sua função na duplicação do RNA viral. É capaz de adoptar uma estrutura tipo tRNA com duas ansas e uma pseudoansa. No entanto, o RNA2 do TRV pode ser apenas adenilado e não aminoacetilado (MacFarlane, 1999). A extremidade não codificante a 5' varia consideravelmente em tamanho entre os vários Tobravírus e diferentes estirpes. Esta região assume uma estrutura tipo tRNA implicada também na duplicação eficiente do RNA2.

A maioria dos RNA2 dos Tobravírus codifica uma proteína envolvida na construção da cápsula do vírus (MacFarlane, 1999). Apesar do gene PC ser o mais próximo da extremidade 5' do RNA2 não é traduzido directamente a partir do RNA genómico mas sim de um RNA subgenómico (sgRNA). Esta estratégia torna-se necessária na medida em que a região não codificante 5' tem cerca de sete codões de iniciação da tradução antes do

codão AUG funcional. O sgRNA da PC só tem um AUG funcional. O promotor para a transcrição deste sgRNA define qual na medida que inicia o sgRNA num local específico.

As subunidades da PC dos Tobravírus enrolam-se de forma similar à dos hordeiviruses e tobamovirus (para citações ver MacFarlane, 1999). Formam uma cápsula em forma de bastonete em que as subunidades se organizam numa sequência helicoidal apertada. As extremidades N – terminal e C – terminal estão localizadas na superfície externa da partícula viral. No PepRSV a região C – terminal é desestruturada e, presumivelmente, estende-se para lá da superfície da partícula viral. Esta protuberância flexível pode ter um papel importante no reconhecimento pelos nemátodos das partículas dos Tobravírus (para citações ver MacFarlane, 1999).

O RNA2 pode codificar ainda mais dois genes, 2b e 2c. A proteína codificada pelo gene 2b é crucial para a transmissão do vírus por nemátodos (para citações ver MacFarlane, 1999). Provavelmente esta proteína interage directamente com locais de retenção específicos dentro do esófago dos nemátodos. É também da responsabilidade desta proteína a especificidade vector/vírus (MacFarlane, 1999). A função da proteína 2c ainda não foi descrita mas deve estar também relacionada com a transmissão do vírus.

RNAs SUBGENÓMICOS

Muitos vírus de RNA, incluindo os Tobravírus, contêm mais de um gene ou grelha de leitura (ORF – open reading frame) na mesma molécula de cadeia simples de RNA. Normalmente os genes traduzidos directamente estão relacionados com a síntese de novas moléculas de RNA, por exemplo o da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). Esta enzima sintetiza novos RNAs, incluindo os subgenómicos. Os RNAs subgenómicos compreendem apenas determinada ORF das moléculas de RNA virais. Os RNAs subgenómicos expressam produtos necessários durante as etapas intermédias ou finais da infecção. Podem corresponder a proteínas estruturais, implicadas na formação da cápsula proteica, ou responsáveis pelo movimento, envolvidas na patogenicidade (Koev *et al.*, 2000; Miller, 2000). Os RNAs subgenómicos de um vírus de cadeia positiva têm todos a mesma extremidade 3' do gene genómico. O que diferencia os RNAs subgenómicos é a distância da sua extremidade 5' em relação ao codão de iniciação a 3' (Miller, 2000).

A expressão dos genes internos do genoma viral é conseguida por uma de várias estratégias que incluem a síntese de RNAs subgenómicos, início da tradução internamente, leaky scanning, frameshift e readthrough (Schirawski, 2000).

A síntese de sgRNAs é uma estratégia comum a vários vírus de RNA de cadeia positiva. A combinação com outros mecanismos como o processamento proteolítico pós-traducional de poli-proteínas percursoras e outras estratégias traducionais permitem tirar o melhor partido do matetial genético do vírus (Koev *et al.*, 2000).

Foram propostos dois modelos básicos para a síntese de RNAs virais mais reduzidos que o RNA genómico, os sgRNAs. O primeiro implica a síntese de uma cadeia de RNA negativa complementar do RNA genómico. O RNA subgenómico seria iniciado no interior desta cadeia negativa (para citações ver Miller, 2000). O segundo defende a terminação prematura da síntese da cadeia negativa. Origina-se uma cadeia negativa mais curta que serve de molde ao RNA subgenómico (para citações ver Miller, 2000). Há ainda a considerar a síntese 5' leader-primed e um outro processo derivado da recombinação do RNA viral (Koev *et al.*, 1999).

A síntese de sgRNAs pode ser regulada por sequências leader pelo menos em *Nidovirales* (para citações ver Miller, 2000). Sequências leader são pequenos fragmentos localizados a 5' na cadeia positiva que funcionam como iniciadores da síntese dos sgRNAs ficando integrados neles. A transcrição de determinado gene teria que ocorrer em duas etapas, ou seja, ser descontínua. Primeiro produziam-se as sequências leader que induziriam a síntese do sgRNA ao emparelharem-se com regiões do promotor da cadeia negativa. Em MHV (mouse hepatitis coronavirus) as sequências leader não apresentam complementaridade com a região intergénica a 3' da cadeia negativa, correspondente ao promotor subgenómico. Isto cria a necessidade de uma nuclease proofreading que remova as bases erradas antes que a indução da transcrição ocorra. Não existe é nenhuma evidência de que assim seja (para citações ver Miller, 2000). Uma nuclease profreading explicaria também porque os coronaviruses possuem genoma de grandes dimensões sem acumular mutações letais. Outra possibilidade é a regulação pelas sequências leader ser mediado por factores proteicos e o emparelhamento com o promotor servir apenas um alinhamento mais preciso desses factores (Miller, 2000). Em alternativa, a transcrição descontínua pode ocorrer durante a síntese da cadeia negativa (Miller, 2000). No entanto, o emparelhamento, mais que a sequência, entre as sequências leader da cadeia positiva e a região intergénica da cadeia negativa correspondente ao promotor demonstrou-se ocorrer (para citações ver Miller, 2000). van Marle (para citações ver Miller, 2000) defende que a replicase se mantém acoplada à cadeia negativa em formação. A replicase afasta a cadeia pré-formada da região intergénica onde se iniciou a sua síntese e reemparelha-a com as sequências homólogas na região leader a 5'. A região leader caracteriza-se por uma ança exposta. A transcrição da cadeia negativa prossegue a partir daqui em direcção à extremidade 5'. Este mecanismo assemelha-se ao da recombinação do RNA e não necessita de proofreading.

A recombinação do RNA genético é um processo que liga dois segmentos de RNA não contíguos (Lai, 1992). É um processo importante na evolução e adaptação dos vírus ao criar vírus quiméricos , recuperar genomas funcionais a partir de RNA mutados e contribui para a ubiquidade dos vírus a nível de hospedeiros (quasispecies) (Nagy *et al.*, 1996). Os recombinantes podem ser homólogos, provenientes de RNAs iguais, ou não-homólogos quando derivam de RNAs dissemelhantes (Lai, 1992).

No TCV observa-se uma alta frequência de recombinação entre o sat-RNA C e o sat-RNA D com os locais de recombinação (junções) agrupados perto da extremidade 3' do sat-RNA D e na base de uma ança presente no centro do sat-RNA C – ança C. Parte da sequência da ança C apresenta similaridade com a extremidade 5' do RNA genómico do TCV que provavelmente possui o promotor para a síntese do sgRNA. Estes resultados sugerem que a ança C está envolvida no recrutamento da RdRp durante o início da síntese (do sat-RNA C) que se segue ao emparelhamento da zona iniciadora, proveniente do sat-RNA D (template switch) (Nagy *et al.*, 1998). A RdRp viral utiliza a cadeia positiva do sat-RNA D em formação como um iniciador do alongamento do sgRNA do sat-RNA C durante a recombinação. Outro sistema de recombinação ocorre entre o sat-RNA D e o RNA genómico do TCV (para citações ver Nagy *et al.*, 1998). Um local chave (hot spot) para a recombinação está localizado na região não codificante a 3' do RNA genómico na base de uma ança – ança 3. A ança 3 contém duas sequências repetidas em tandem que são semelhantes à extremidade 5' de dois sgRNAs do TCV. Para além de direccionar a recombinação a ança 3 é importante na viabilidade do RNA genómico (para citações ver Nagy *et al.*, 1998). A recombinação mediada pela RdRp viral pode ser dividida em três etapas: (i) formação de um iniciador no RNA dador; (ii) transferência do iniciador e ligação da RdRp ao RNA receptor; (iii) alongamento do RNA receptor (Lai, 1992).

O modelo mais vastamente reconhecido para a síntese de RNAs subgenómicos implica o início da actividade da replicase no interior de moléculas de RNA negativas (Miller *et al.*, 2000). A RNApolimerase dependente de RNA (RdRp) reconhece determinados motivos do promotor - flanqueado por domínios reguladores – localizado a montante do local onde a síntese da nova cadeia positiva, o sgRNA, começa. Embora este mecanismo se aplique ao *Bromovirus* (Miller *et al.*, 1985) não se aplica a todos os vírus de RNA. No caso do red clover necrotic mosaic virus (RCNMV) a síntese da cadeia negativa termina de forma prematura. O emparelhamento entre pares de bases das duas cadeias do genoma deste vírus cria uma estrutura que por si só ou com a ajuda de factores proteicos promove o fim da actividade da RdRp, a sua dissociação das cadeias de RNA e concomitante libertação da cadeia negativa recém-sintetizada. Esta serve de molde à cadeia subgenómica, positiva (Miller, 2000).

Em todos os vírus que produzem vários sgRNAs aqueles que se localizam a 3', da cadeia positiva, tendem a ser os mais abundantes. Miller (2000) propõe que quando a replicase, deslocando-se para 5' ao longo da cadeia genómica positiva, sintetiza o promotor subgenómico da cadeia negativa a que se associa uma proteína que serve de chamariz a outras replicases que sintetizam o sgRNA (ver figura 3). Se a quantidade desta proteína na célula for limitada ou se as replicases a reconhecerem facilmente a síntese dos sgRNA ocorrerá mais próximo da extremidade 5' da cadeia negativa. É igualmente plausível que a proteína de reconhecimento do promotor esteja acoplada transitoriamente à replicase, ficando junto ao promotor subgenómico da cadeia negativa quando este é

sintetizado. Este processo não seria completamente eficiente e algumas replicases não libertariam o factor de reconhecimento no primeiro promotor mas sim no promotor mais a 3' (da cadeia negativa) ou nos seguintes. Por outro lado, os diferentes promotores podem ter diferentes afinidades para os factores de reconhecimento o que explicaria uma regulação diferencial da síntese dos vários sgRNAs do vírus, independentemente da posição no genoma (Miller, 2000).

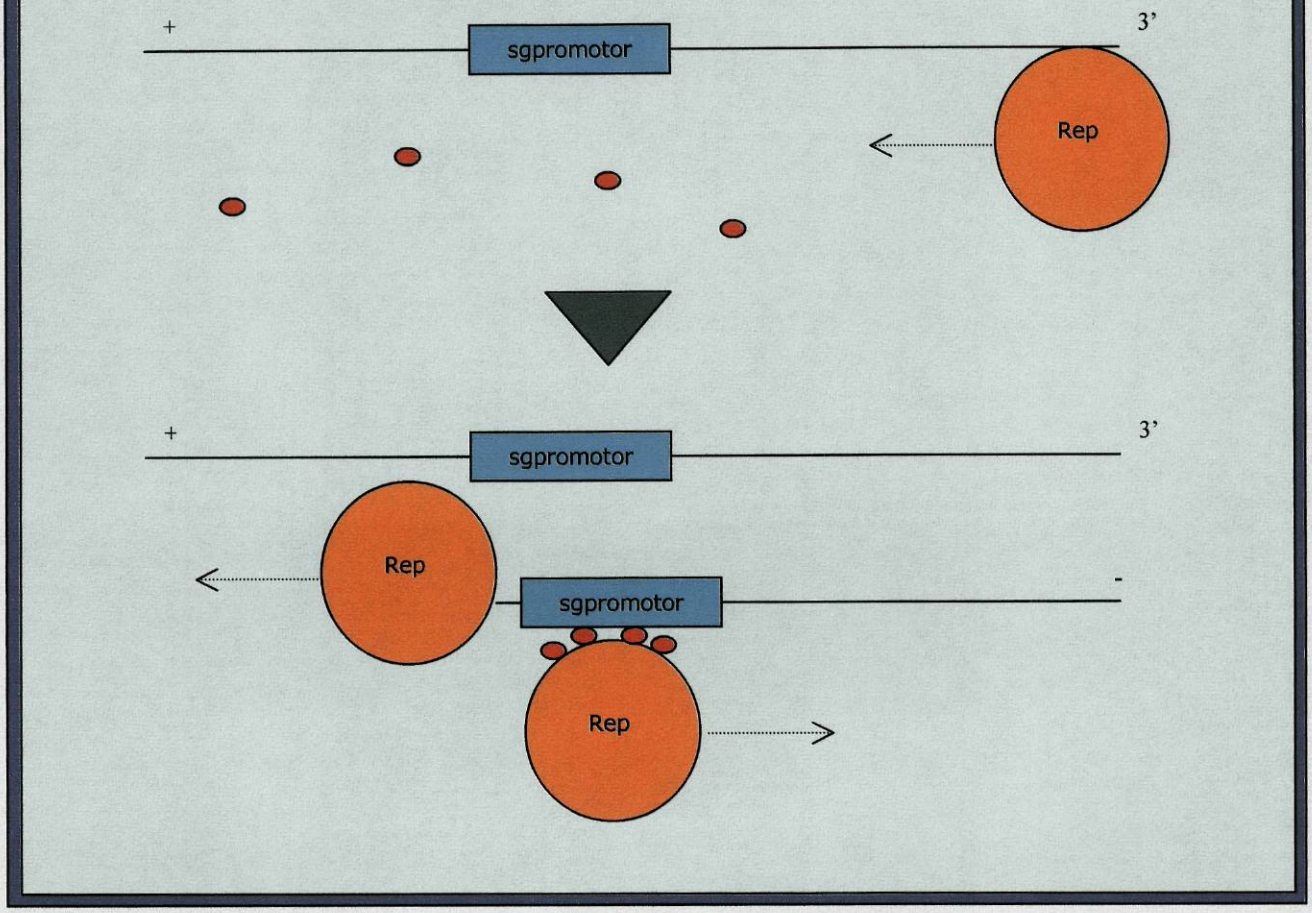


Figura 3 – Representação esquemática do modelo proposto por Miller (2000) para a síntese de sgRNAs.

Koev *et al.* (2000) defende que a atenuação da transcrição dos sgRNAs de maiores dimensões pode resultar na dissociação da RdRp viral quando encontra um promotor subgenómico que funcionaria como terminador. É também plausível que ocorra a terminação da actividade da RdRp e consequente dissociação da cadeia negativa quando se acoplam aos promotores a jusante os complexos de transcrição dos sgRNAs. Quando a replicase encontra um promotor subgenómico em actividade é forçada a parar o que aumenta a probabilidade de se dissociar do RNA, terminando a síntese de sgRNAs (ver figura 4). Os sgRNAs maiores encontram mais obstáculos durante a sua síntese e portanto são menos abundantes.

Van Marle (1995) relacionou a eficiência de transcrição dos vários promotores subgenómicos com a sua posição no genoma, o que se explica pela presença de sequências flanqueadoras não específicas em determinados locais. Acrescentou ainda que existe inibição significativa da actividade de um promotor pela presença a jusante de um promotor funcional. No entanto, o contrário não se verifica. Acrescente-se ainda que a capacidade de inibição de um promotor sobre outro diminui com a distância.

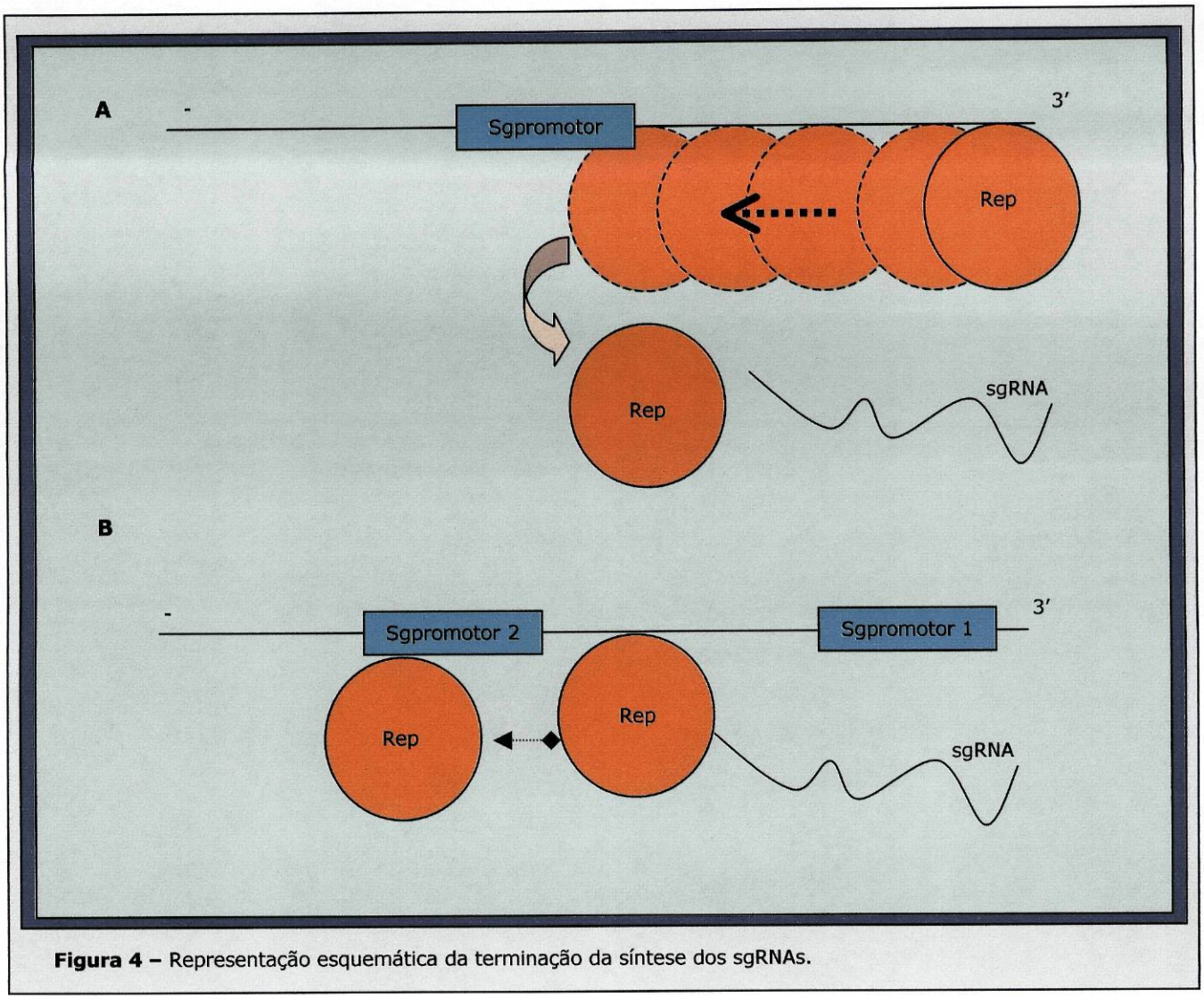


Figura 4 – Representação esquemática da terminação da síntese dos sgRNAs.

OS PROMOTORES VIRAIS SUBGENÓMICOS

Seguindo o critério adoptado por Miller *et al.* (2000) designa-se como promotor de sgRNA as sequências que regulam a síntese desses RNAs. A definição das regiões genómicas correspondentes aos promotores baseou-se em vários métodos como mutações direccionadas (site-especific), duplicação da hipotética região do promotor seguida de mutações deletérias, comparações filogenéticas e utilização de sondas químicas e enzimáticas (Schirawski *et al.*, 2000).

As sequências ou estruturas características dos promotores virais consistem em caudas poly-A, pseudoanças (pseudoknots), estruturas tipo tRNA, anças (stem-loop structures) e sequências primárias sem estrutura secundária definida. Sendo assim, os promotores de transcrição têm pelo menos duas funções: (i) recrutar a RdRp; (ii) promover a síntese do RNA complementar a partir de um determinado nucleótido inicial.

O mapeamento dos promotores subgenómicos de al.guns vírus caracteriza-os como tendo menos de cem pares de bases e localizando-se em grande parte a montante do local de iniciação da transcrição (Miller *et al.*, 2000). No entanto, é também de considerar que componentes essenciais dos promotores subgenómicos se localizem a jusante do local de iniciação de transcrição, a montante mas a uma distância considerável ou mesmo numa outra molécula de RNA (Miller *et al.*, 2000). Um exemplo de regulação da síntese de RNAs subgenómicos por elementos-cis (da mesma cadeia) ocorre por emparelhamento a longa distância destes com regiões perto do local de iniciação da transcrição. Mutações que comprometam o emparelhamento potencial entre a região 5' do RNA genómico do vírus da batata X (PVX) e regiões a montante do local de iniciação dos sgRNA abolem a transcrição. Mutações compensatórias que restabeleçam o emparelhamento entre as duas regiões promovem a transcrição embora não ao nível inicial. Isto indica que o emparelhamento juntamente com a sequência das bases do RNA são importantes (para citações ver Miller *et al.*, 2000). Outro exemplo interessante da acção de elementos cis ocorre num vector derivado do TMV (para citações ver Miller *et al.*, 2000).

A inserção de três pseudoanças derivadas do 3'UTR (untranslated region) do RNA do TMV atrás da ORF da GFP, localizada na região do gene da proteína da cápsula, resultou no aumento da transcrição do sgRNA da GFP pelo promotor do gene da proteína da cápsula. Isto também resultou na diminuição da transcrição dos sgRNAs mais próximos da extremidade 3', o que sugere que as pseudoanças concentram a actividade das polimerases virais no promotor imediatamente a jusante. No final, transparece uma enorme variação entre promotores de diversos vírus o que pode reflectir uma transcrição diferencial dos sgRNAs típicos de cada espécie vírica (para citações ver Miller *et al.*, 2000).

Nagy *et al.* (1999) defendem que as anças envolvidas na recombinação dos RNAs satélite do TCV funcionam também como elemento *cis* no recrutamento da RdRp viral. Facilitam a síntese de RNA *de novo* a partir de um promotor localizado a jusante, dos RNAs satélite, aumentando o nível de transcrição dos produtos da RdRp do TCV. A presença das anças pode elevar a taxa de iniciação da síntese do RNA, aumentar a eficiência (processivity) da RdRp, aumentar a taxa de terminação da síntese do RNA seguida da reutilização da RdRp ou uma combinação destes processos. Os promotores do TCV são constituídos por dois componentes não necessariamente contíguos: (i) uma ança indutora que recruta a RdRp e outros factores da replicação; (ii) uma sequência linear que

é utilizada pela RdRp para iniciar a síntese de RNA de uma forma independente de iniciadores. O papel das anças de recombinação como atractores de RdRp com intuito de síntese de RNA é consistente com o facto de cópias adicionais da ança C aumentar os produtos de transcrição (Nagy *et al.*, 1999). A natureza modular dos promotores pode ser vantajosa para os vírus visto a rápida deleção ou duplicação de elementos *cis* aumentarem a competitividade ou adaptação dos vírus em relação ao hospedeiro (Nagy *et al.*, 1999).

Os promotores de sgRNAs podem também variar dentro da mesma espécie vírica. Por exemplo, os três promotores de sgRNAs do "barley yellow dwarf virus" (BYDV) são bastante diferentes tanto a nível da estrutura primária e secundária como da sua posição relativamente ao local de iniciação (Koev *et al.*, 2000). Porém, tendo em conta que os promotores de sgRNAs de um dado vírus são reconhecidos pela mesma replicase viral não é descabido propor a conservação de certos motivos que determinam a especificidade deste reconhecimento. De facto, vírus com mais de um sgRNA contêm pequenas sequências homólogas perto dos seus locais de início da transcrição (para citações ver Koev, 2000). Estas sequências são insuficientes para induzir a transcrição mas fazem parte dos promotores subgenómicos. Por exemplo, o "turnip crinkle virus" (TCV) contém anças estáveis nos dois promotores subgenómicos para al.ém de uma sequência GGG junto dos locais de início da transcrição (Wang *et al.*, 1997).

Uma força motriz potencial para a evolução de promotores divergentes na mesma molécula de RNA prende-se com o tamanho limitado dos genomas virais. Torna-se necessário a sobreposição dos promotores com os genes antecedentes. Os promotores subgenómicos por vezes têm de ser forçosamente parte integrante de uma sequência já com significado, como por exemplo uma ORF. A flexibilidade da estrutura do promotor e do mecanismo de síntese maximiza as oportunidades de uma dada sequência acumular funções. É provável que os promotores subgenómicos tenham evoluído de forma independente (Miller *et al.*, 2000). Por outro lado, os diversos promotores de um dado RNA vírico viabilizam uma regulação temporal e quantitativa divergente para os vários sgRNAs (Koev *et al.*, 2000).

O PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA DOS TOBRAVÍRUS

A bibliografia encontrada sobre este assunto foi escassa e resume-se ao que a seguir se expõe. É característico dos promotores subgenómicos dos Tobravírus a existência de um motivo GCAUA a montante das diferentes ORFs (Goulden *et al.*, 1990). Goulden *et al.* (1990) descreve ainda a presença de uma determinada estrutura secundária no promotor do gene da proteína da cápsula. A associação das estruturas secundárias e do motivo GCAUA a montante das ORFs das proteínas da cápsula descritas

(Goulden *et al.*, 1990) deve ter significado biológico uma vez que (1) todas têm o mesmo tamanho, dezoito nucleotídios incluídos no pé e quatro na parte superior da ança, ou seja, são conservadas em tamanho embora não o sejam em sequência (2) todas ocorrem exactamente na mesma posição relativamente ao motivo GCAUA - imediatamente a montante - e (3) todas estão entre as estruturas secundárias mais estáveis adoptadas pela cadeia negativa em programas de computador (para citações ver Goulden *et al.*, 1990).

Experiências de "site-directed mutagenesis" confirmaram que o emparelhamento dos nucleótidos para manter esta estrutura tipo ança é essencial para a expressão do gene PC (para citações ver MacFarlane, 1999). Acrescente-se que a região a montante do codão de iniciação da PC do PEBV que contém uma ança, pode funcionar como promotor se transferida para outras partes do genoma (para citações ver Mueller *et al.*, 1997).

RECONHECIMENTO DO PROMOTOR SUBGENÓMICO PELO COMPLEXO REPLICASE

A infecção viral implica para a replicase a possibilidade de reconhecimento de três promotores para um dado gene: o do sgRNA, o da cadeia negativa e o da cadeia positiva. Tomando como exemplo o BMV podemos definir três tipos de promotores: uma estrutura tipo tRNA a 3' da cadeia positiva que induz a síntese da cadeia negativa; um promotor a 3' da cadeia negativa que induz a síntese da cadeia genómica positiva; por fim, os promotores subgnómicos localizados no interior da cadeia negativa (Stawicki, 1999).

O início da transcrição em cada um destes três sítios em detrimento dos outros tem de ser regulado com precisão (Miller, 2000). Os promotores subgenómicos são estruturalmente dissemelhantes dos promotores genómicos quer positivos quer negativos. A replicase ou tem um local de ligação ao RNA multi-funcional com regiões distintas para cada promotor ou dentro do complexo da replicase existem proteínas específicas de ligação ao RNA do promotor subgenómico. Nesta segunda hipótese estas proteínas teriam de modular o promotor do sgRNA para ser reconhecido pela RdRp codificada pelo genoma viral (Miller, 2000). As proteínas que viabilizam a associação RdRp aos promotores do sgRNA ou do RNA genómico poderiam existir em separado (Miller, 2000). As proteínas nsp do alphavirus são um exemplo. As proteínas nsp2 e nsp3 afectam a síntese do sgRNA 26S do alphavirus. As proteínas nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4, via readthrough por um codão de terminação fraco, são produzidas como uma única proteína que é dividida nas várias subunidades posteriormente. A síntese da cadeia genómica negativa fica a cargo do complexo nsp1-nsp2-nsp3-nsp4. A síntese da cadeia genómica positiva e do sgRNA só ocorrem fruto da existência das proteínas nsp2 e nsp3 individualizadas (para citações ver Miller, 2000).

É curioso mas pode existir o envolvimento de proteínas do hospedeiro no reconhecimento directo do promotor subgenómico. Embora pareça contra-intuitivo o que é possível que aconteça é que a taxa de mutação elevada e o curto período de vida do vírus lhe permitam adaptar-se mais rapidamente ao hospedeiro do que este conseguir escapar ao reconhecimento e aproveitamento pernicioso das suas proteínas por parte do vírus (Miller, 2000). A Natureza foi pródiga em estratégias para a regulação da síntese de sgRNAs.

O grupo de Kao (para citações ver Miller, 2000) estudou o promotor subgenómico do RNA4 do BMV. Descobriu que um motivo de 21 pares de bases é suficiente para a transcrição básica do sgRNA. O sgRNA4 do BMV codifica a PC, estando a sua sequência localizada a 3' do RNA3 genómico (Miller *et al.*, 1985). Dentro desta sequência apenas algumas bases azotadas em determinadas posições tinham um papel activo. Uma ança que incorpora todas estas bases é uma estrutura essencial neste promotor (para citações ver Miller, 2000).

A sequência mínima de promotor requerida *in vitro* é geralmente insuficiente *in vivo*. São necessárias sequências adicionais que permitam ao complexo da replicase aproximar-se do promotor ou que o apresentem de modo acessível. Uma combinação da sequência primária do RNA e de elementos estruturais secundários (anças e pseudoanças) parecem ser necessárias. No entanto, *in vitro* não se conseguiu demonstrar a importância da estrutura secundária na actividade do promotor (Siegel *et al.*, 1997). A análise *in vitro* do promotor do sgRNA4 do BMV revelou quatro elementos estruturais fundamentais na transcrição: um promotor central, um sinal AU a jusante do local de iniciação, um sinal poli-A e um elemento indutor a montante do promotor central (Marsh *et al.*, 1988).

A RdRp reconhece o promotor do sgRNA através da sequências específicas do seu promotor. A região entre o nucleótido −17 e −13 (relativamente ao local de iniciação da transcrição) é importante para a síntese eficiente do sgRNA. A região −11 a +1 não é essencial mas pode ser necessária à correcta selecção do local de iniciação pela RdRp. Assim, o promotor do sgRNA do BMV pode ser dividido em três domínios funcionais: um domínio específico que se presume é o local de contacto com a RdRp, uma sequência intermédia (spacer) mais tolerante a al.terações nucleotídicas e de tamanho, e o local de iniciação. A sequência intermédia deve manter uma distância óptima entre o domínio específico e o local de iniciação (Siegel *et al.*, 1997).

O reconhecimento do local de iniciação pela RdRp da BMV requer uma interacção trimolecular entre a RdRp, o RNA genómico e um nucleótido iniciador GTP. O emparelhamento entre o nucleótido +1 (1º nucleótido do local de iniciação da transcrição) e o GTP deve ser responsável pelo aumento da estabilidade da interacção RdRp-RNA (Stawicki *et al.*, 1999). O nucleótido +2 é normalmente adenilado nos promotores que dirigem a síntese de RNA da cadeia positiva. Parece ser um requesito para a iniciação eficiente da síntese de RNA. A exigência de um nucleótido +2 de iniciação adequado pode

explicar a preferência pelo local de iniciação autêntico entre os vários existentes no promotor subgenómico (para citações ver Stawicki *et al.*, 1999).

O estudo de inserções e mutações de nucleotidos essenciais do domínio específico do promotor levaram Stawicki *et al.* (1999) a sugerir que a RdRp tem a capacidade de se ajustar ao RNA de uma forma análoga a ter-se suspensões independentes nos pneus de um todo-o-terreno. A RdRp do BMV tem de reconhecer as três classes de promotores do genoma do BMV. Estes promotores não têm pontos em comum para lá do nucleotido +1 de iniciação ser sempre citidilado (cytidylate). Stawicki *et al.* (1999) hipotiza que o reconhecimento da zona essencial (core) do promotor pela RdRp se dá através de apenas alguns nucleotidos colocados em posições aceitáveis. A RdRp é então capaz de ajustar os seus locais de contacto com o promotor ou alterar a estrutura local do promotor de acordo com os nucleotidos chave. A flexibilidade da RdRp permite ao promotor acumular funções importantes na infecção viral como uma maior eficiência de tradução.

Siegel *et al.* (1997) defende para os alphavírus um modelo em que a RdRp reconhece uma sequência específica do promotor. Este modelo é similar ao da RNA polimerase dependente de DNA (DdRp). As DdRps interactuam com os seus moldes essencialmente via contactos com sequências determinadas (para citações ver Siegel *et al.*, 1997).

Por sua vez, o dogma corrente postula que a RdRp interactua com determinadas estruturas do RNA que permitem o contacto com nucleótidos fora dessa estrutura (para citações ver Siegel *et al.*, 1997). Estas estruturas tomam a forma de ansas ou pseudoansas. No entanto, Siegel *et al.* (1997) apresenta algumas evidências para o facto das estruturas secundárias poderem tornar a síntese da cadeia negativa completa mais eficiente mas terem um papel negligenciável no reconhecimento do promotor subgenómico pela RdRp. No caso do BMV a ansa tem uma energia livre baixa o que implica uma temperatura de desnaturação de 20ºC, bem abaixo dos 30ºC utilizados por Siegel *et al.*(1997) *in vitro*, ou seja, a produção de sgRNAs *in vitro* não contou com a existência de uma ansa. Um mutante que reforça a estrutura secundária tem um efeito adverso na síntese dos sgRNAs *in vitro*.

Chen *et al.* (2000) utilizando a análise de delecções em CMV (cucumber mosaic virus) acabou por demonstrar que uma ansa presente a montante do local de iniciação, no promotor do sgRNA do RNA4, é responsável pelo começo eficiente e correcto da sua síntese. Neste virus a ansa do promotor e um nucleótido citidilato (C) de iniciação são os requisitos mínimos para o reconhecimento por parte da replicase. É curioso que a estrutura secundária do promotor do sgRNA mantenha o seu papel depois de sofrer al.gumas modificações. Embora a sua presença seja essencial os seus nucleótidos podem ser completamente substituídos sem perda significativa de função (Chen *et al.*, 2000). No entanto, a sequência selvagem apresenta a melhor performance na síntese do sgRNA.

O BYDV pertence ao género *Luteovirus*. Possui um genoma constituído por uma molécula positiva de RNA a partir da qual são produzidos três sgRNAs 3' co-terminais (Koev *et al.*, 1999). O promotor do sgRNA1 possui duas anças, SL1 e SL2. Mutações no promotor subgenómico do BYDV desvendaram três tipos de estruturas: (1) na base da SL1 a estrutura secundária é essencial à transcrição; (2) uma região ambígua, a parte superior da cadeia dupla da ança SL1, onde a estrutura primária e possivelmente a estrutura secundária influenciam a eficiência da transcrição; (3) na ança SL2 apenas a estrutura primária é necessária. Tal como noutros vírus o local de iniciação localiza-se numa zona de cadeia simples (Koev *et al.*, 1999).

Koev *et al.* (1999) propõem que a ança SL1 actua como local de reconhecimento para a replicase, colocando-a na proximidade do local de início da transcrição. A parte inferior da cadeia dupla da ança deve servir apenas como base estrutural que assegura que a zona superior da ança apresenta a orientação adequada para uma ligação específica à replicase. A região superior da cadeia dupla, estruturada de forma ambígua, tem um papel auxiliar ao distanciar correctamente a parte superior da ança do local de iniciação.

Em alternativa os mesmos autores deixam em aberto a possibilidade de que os sgRNAs sejam sintetizados a partir de cadeias negativas terminadas prematuramente. Existem indícios de que a montante da região correspondente ao sgRNA na cadeia positiva existem, para al.ém das anças SL1 e SL2, outras anças complementares que inibiriam a migração da replicase favorecendo a terminação. A extremidade 3' da cadeia negativa truncada lembrariam a verdadeira extremidade 3' da cadeia negativa com a homolgia CACUUC que permitiria o reconhecimento e actividade da replicase.

O TYMV , um estereótipo dos Tymovírus, possui um genoma composto por uma cadeia positiva simples de RNA. Contém três ORFs. A proteína da cápsula, cuja ORF é 3' coterminal com a ORF da RdRp na cadeia positiva, é sintetizada via um sgRNA (Schirawski *et al.*, 2000). Uma análise da região circundante do local de início da síntese do sgRNA do TYMV pôs em evidênciaa presença de duas sequências altamente conservadas numa região designada "tymobox". O bloco 5' da "tymobox" é idêntica em 11 de 15 sequências de vários Tymovírus. Sete a oito nucleóticos a jusante surgem os quatro nucleótidos da caixa de iniciação. A inserção de mutações tanto na "tymobox" como na caixa de iniciação abolem a produção do sgRNA (Schirawski *et al.*, 2000). A "tymobox" pode estar envolvida na formação de uma estrutura secundária que não parece ser importante para a actividade do promotor.

SÍNTESE DA CADEIA NEGATIVA

Os genomas de um número considerável de vírus de RNA de cadeia positiva contêm estrutura 3'-terminal que se assemelha a tRNAs. Estas estruturas funcionam como

substratos em interacções com aminoacil-tRNAsintetase, factores de alongamento EF-Tu e EF-1α e (CTP, ATP): tRNA nucleotidiltransferases (para citações ver Dreher *et al.*, 1996).

A duplicação do RNA do vírus do mosaico amarelo do nabo (turnip yellow mosaic virus – TYMV) depende da sua associação a determinados aminoácidos – aminoacetilação. A natureza do aminoácido não é um factor importante. Por exemplo, a aminoacil - tRNAsintetase que naturalmente interage com o genoma do TYMV é a valinacil – tRNA sintetase. A aminoacetilação pela valina não parece ser o evento crucial na duplicação do RNA genómico uma vez que o genoma deste vírus tem capacidade de infecção e estabilidade nas plantas se for aminoacetilado com o aminoácido metionina. O elemento necessário ao reconhecimento pelas aminoacil – tRNAsintetase, tanto de valina como metionina, encontra-se na ança do anti-codão (Dreher *et al.*, 1996). Dreher *et al.* (1996) depararam ainda com a necessidade de introduzir mutações no pé da ança tipo-tRNA para obter uma boa eficiência em condições fisiológicas o que sugere que aminoacil – tRNAsintetases diferentes podem exigir anças (pseudoknots) de diferentes estabilidade ou design. A ança 3'-terminal do genoma do TYMV parece ser o impedimento estrutural e não os elementos de reconhecimento das aminoacil – tRNAsintetases.

Um modelo antigo defende que a duplicação dos genomas dos vírus vegetais necessitam da interacção do RNA com factores de alongamento (EF) implicados na tradução. Estes factores de alongamento traducionais interagem com o RNA viral aminoacetilado (para citações ver Giegé, 1996). No processo de tradução eucariótico clássico o factor de alongamento inicial – eIF2 - forma um complexo com GTP mediando a ligação metioninacil-tRNA à subunidade pequena do ribossoma e assim, à extremidade 5'do mRNA, iniciando a tradução (Alberts, B. *et al.* , 1994).

No caso do bacteriófago Qβ o factor de alongamento associado ao RNA viral – EF-Tu – é uma subunidade da replicase (para citações ver Giegé, 1996). Conclusão, a aminoactilação do RNA viral permite a ligação de um factor de alongamento traducional a um local específico do genoma. Este é reconhecido pela replicase, o que permite a duplicação do RNA genómico do vírus. No entanto, o factor de alongamento vegetal associado com uma replicase vírica ainda não foi descoberto. Coloca-se a hipótese de não ser um factor de alongamento autêntico mas uma proteína semelhante (Giegé, 1996). Dreher (para citações ver Giegé, 1996) publicou trabalhos com o vírus do mosaico brómico (Brome mosaic virus – BMV) que não apresenta correlação entre a aminoacetilação pela tirosina e a duplicação do RNA vírico. Esta pode ser dispensável se ocorrer aminoacetilação por histidina (Giegé, R., 1996). O que fica é que estruturas tipo ança do RNA vírico semelhantes às apresentadas pelos tRNAs vegetais são importantes como substratos para as diferentes aminoacil – tRNAsintetases e respectivos factores de alongamento traducionais. É a estes que se liga a maquinaria responsável pela duplicação.

Dreher (para citações ver Giegé, 1996) verificou que se se mutasse a estrutura tipo tRNA do TYMV, específica para a valinacil – tRNAsintetase, de modo a mimetizar o

determinante da metionina a eficiência de reconhecimento da metioninacil – tRNAsintetase era reduzida. Tal como acontece com as mutações ocorridas nos tRNAs canónicos. Este facto era revertido se se encurtasse uma das cadeias da pseudoança do RNA vírico. Isto porque desestabilizaria a pseudoança facilitando a sua adaptação à metioninacil – tRNAsintetase. A ança formada pelo RNA é a estrutura arquitectónica que permite o reconhecimento por uma aminoacil – tRNAsintetase específica. Diferentes estruturas podem preencher o mesmo "contra-molde". Daí que os tRNAs canónicos e as anças do RNA vírico sejam reconhecidos pelas mesmas aminoacil – tRNAsintetase. Lógico que a diversidade reconhecida por uma aminoacil – tRNAsintetase tem limites estreitos.

O ciclo viral compreende as seguintes etapas: atracagem, entrada na célula, perda da cápsula, tradução, duplicação do RNA, encapsulação e dispersão. Estes passos são senquenciais no tempo nesta ordem. No entanto, ocorre uma sobreposição significativa entre a tradução e a duplicação do RNA devido à interdependência destes dois processos (para citações ver Barton *et al.*, 1999).

Um dilema comum a todos os vírus de RNA de cadeia positiva é a colisão potencial entre a replicase viral e os ribossomas durante a síntese da cadeia negativa. O RNA genómico tem de ser traduzido, permitindo a produção da RdRp, antes da síntese da cadeia negativa ser iniciada. Nalgum ponto o RNA viral passa de mRNA, envolvido na tradução, a molde para a síntese da cadeia negativa. A partir daqui os vírus têm de evitar a presença dos ribossomas em tradução que inibem o alongamento da cadeia negativa (Barton *et al.*, 1999).

Barton *et al.* (1999) demonstraram que a existência de ribossomas em tradução no RNA genómico de poliovirus antes da formação dos complexos de replicação inibe a síntese da cadeia negativa. A presença de puromicina que dissocia os ribossomas do RNA induz a replicação do RNA viral ao fomentar a formação dos complexos de replicação. Em contraste, paralizar os ribossomas no RNA com cicloheximide inibe a replicação viral. A inibição da síntese da cadeia negativa pelos ribossomas em tradução pode ser mediada por dois mecanismos. Uma possibilidade é que a síntese da cadeia negativa não se inicia até os ribossomas terem abandonado por completo o RNA. Este mecanismo infere que a replicase detecta a presença de ribossomas na cadeia positiva do RNA viral. Uma segunda possibilidade é que a replicase inicia a síntese da cadeia negativa enquanto os ribossomas ainda estão activos mas não os consegue desalojar do RNA e, portanto, não prossegue. Em qualquer dos casos, a transição da tradução para a replicação baseia-se na capacidade da replicase desalojar os ribossomas em tradução.

Os poliovirus com certeza desenvolveram um mecanismo para libertar o RNA viral dos ribossomas com o intuito de reduzir ou evitar as colisões com as replicases. Berman *et al.* (para citações ver Barton *et al.*, 1999) verificaram que uma mutação no local onde o RNA se liga no ribossoma diminui dramaticamente a replicação sem afectar significativamente a tradução. Esta mutação deve impedir a regulação negativa normal do

início da tradução, logo a presença contínua de ribossomas no RNA bloqueia a síntese da cadeia negativa. O mecanismo que regula a transição da tradução para a replicação deve envolver a ligação entre uma proteína viral e o local de ligação do RNA no ribossoma ou um factor celular necessário ao início da tradução, inibindo a sua acção (Barton *et al.*, 1999).

O genoma do TMV é constituído por uma única molécula de RNA positiva. Produz directamente duas RdRps enquanto que a proteína de movimento e a proteína da cápsula são traduzidas a partir de sgRNAs 3'-terminais. A região não codificante na extremidade 3' (3'UTR) consiste numa sequência altamente conservada e estruturada com várias anças (hairpin loop). Possui dois domínios estruturais: o domínio 3' terminal com duas anças importantes para a formação da estrutura tipo tRNA (TLS), ligadas a outro domínio em forma de ança a montante (UPD) – um filamento em dupla hélice que contém 3 anças consecutivas (ZeenKo *et al.*, 2002). A TLS pode ser aminoacetilada e ligar-se a várias enzimas específicas para o tRNA. Duas das anças da UPD são filogeneticamente conservadas em todos os Tobamovirus, satélites de TMV e Hordeivirus tanto na localização como na estrutura e posições nucleotídicas (para citações ver ZeenKo *et al.*, 2002).

A extremidade 3´do RNA genómico dos vírus de cadeia positiva é tida como região promotora do início da síntese da cadeia negativa de RNA viral. O elemento cis, 3'-terminal mínimo exigido para a iniciação da síntese da cadeia negativa em TMV inclui a TLS e as duas anças mais próximas da extremidade 3' da UDP (ZeenKo *et al.*, 2002). A 3'-UTR do TMV interage de forma específica com CTP, ATP, nucleotidyltransferases, uma aminoacyl-tRNA synthetase e com o factor de al.ongamento eucariótico, 1A (eEF1a). Ainda não se sabe se estas interacções estão envolvidas na replicação viral ou na tradução. Existem fortes indicações de que aumentam a estabilidade do RNA e mantêm a extremidade 3' intacta (para citações ver Zeenko *et al.*, 2002).

No entanto, no TMV a sequência 5' leader encapsidada (capped) e a 3'-UTR interagem de modo a permitir uma eficiente tradução das polimerases virais. A UPD parece substituir a cauda poliA dos mRNAs. Tanto a sequência primária das duas anças UPD como a sua estrutura são necessárias à tradução. A TLS também intervém neste processo (Zeenko *et al.*, 2002).

A replicação do RNA viral envolve tanto componentes virais como do hospedeiro celular. A maioria destes são desviadas da tradução e de mecanismos de processamento do RNA celulares. Isto reflecte uma estreita ligação entre a tradução viral e a replicação do RNA (para citações ver Zeenko *et al.*, 2002).

Zeenko *et al.* (2002), Lai (1998) e outros autores defendem que a tradução e duplicação do RNA dos vírus de cadeia positiva estão associadas. Os vírus provavelmente utilizam as mesmas estruturas do RNA nos dois processos. As várias funções dependem de interacções específicas entre o genoma e as proteínas virais e do hospedeiro. Zeenko

et al. (2002) estudou a interacção específica do factor de alongamento eEF1A com as duas anças 3′ da UPD. Estas anças apresentam uma estrutura e al.gumas posições nucleotídicas bastante conservadas em todos os Tobamovirus (para citações ver Zeenko *et al.*, 2002). A forte exigência para a conservação de determinados nucleótidos na ança 3′ terminal da UPD para que ocorra ligação do eF1A indica que talvez possam entram em contacto directo com a proteína. Sequências primárias específicas na parte superior das anças (loops) devem permitir interacções terciárias (tertiary) importantes para a ligação da proteína (Zeenko *et al.*, 2002).

Zeenko *et al.* (2002) demonstrou que a eEF1A pode interactuar com a UPD da 3′-UTR do TMV não aminoacetilada. Por outro lado, Litvak *et al.* (para citações ver Zeenko *et al.*, 2002) já tinha observado a interacção do mesmo factor de al.ongamento com a 3′-UTR do RNA do TMV – com a região TLS (Zeenko *et al.*, 2002). Em experiências de competição tRNAs-aminoacetilados não competem com o complexo UPD/eEF1A (Zeenko *et al.*, 2002). A região UPD e a região TLS aminoacetilada podem interagir com o eEF1A de forma independente ou simultânea; também é possível que a eEF1A associada à UPD possa interagir com a TLS aminoacetilada localizada a jusante, mediando interacções entre ambos os domínios estruturais. É verdade que a eEF1A tem dois locais de ligação ao RNA sendo capaz de se ligar simultaneamente a aa-tRNA e a rRNas de elevado peso molecular. Possivelmente as anças do UPD mimicam o rRNA como ligando do eEF1A (Zeenko *et al.*, 2002). O local de ligação do eEF1A na UPD, na 3′-UTR, localiza-se na região responsável pela tradução.

O complexo 3′-UTR/eEF1A pode estar envolvido na estimulação do alongamento traducional ou outras etapas da tradução viral. A associação 3′-UTR/eEF1A pode aumentar significativamente a concentração local de eEF1A junto dos RNAs virais em detrimento dos mRNAs celulares. Promove o alongamento traducional ao prevenir a difusão dos factores celulares dos RNAs virais em tradução. Dá à tradução viral uma vantagem selectiva em relação à tradução celular (Zeenko *et al.*, 2002).

Por outro lado, Filichkin *et al.* (2000) rejeitam a hipótese de que a estrutura tipo tRNA do TMYV seja um requisito para a síntese da cadeia negativa de RNA, embora tenha um papel crítico no ciclo de vida do vírus. Existem dados que indicam que (CTP, ATP):tRNAnucleotidiltransferases actuam como uma telomerase para manter intacto o codão CCA 3′ terminal, importante na síntese do RNA. É também possível que a estabilidade do RNA possa ser promovida pela associação a 3′ com uma proteína como por exemplo o eEF1A, mas não parece ser um factor muito relevante. Estes autores propõem que a estrutura tipo tRNa do TMYV permite a regulação negativa do acesso da replicase ao local de iniciação da síntese da cadeia negativa. A TLS valinilada actuaria como uma sequência regulatória (operator) que se associaria à proteína repressora eEF1A.GTP. A RdRp seria incapaz de reconhecer aquela conformação do RNA e não parece ter a capacidade para desenrolar o RNA antes do início da replicação.

É plausível que a repressão da síntese da cadeia negativa seja um acontecimento inicial da infecção vírica que permite uma expressão traducional adequada antes do RNA ser convertido em unidade de replicação (Filichkin *et al.*, 2000). Isto é importante em especial em vírus com forte ligação entre a tradução e a replicação. Nestes sistemas, o primeiro ciclo traducional leva à produção de replicases. O início imediato da síntese da cadeia negativa resultaria na produção insuficiente de proteínas víricas que sustentassem uma infecção capaz de contrariar as defesas do hospedeiro. A ligação da eEF1A.GTP atrasaria a conversão prematura do RNA vira de mensageiro em unidade de replicação. Como esta ligação é forte mas não irreversível alguns RNAs sofrem a transição inversa permitindo simultaneidade da tradução e replicação. À medida que a concentração de replicase aumenta a proporção de RNAs requeridos para a replicação cresce (Filichkin *et al.*, 2000).

Zeenko *et al.* (2002) levanta ainda a hipótese contrária: do complexo 3'-UTR/eEF1A afectar negativamente a tradução. Este complexo poderia facilitar a interacção da replicase vírica com a 3'-UTR, ao promover o reconhecimento e ligação da replicase à 3' UTR. Participaria na inibição da tradução do gRNA antes da ocorrência da replicação. Assim, a ligação do eEF1A à 3'-UTR do TMV pode simplesmente promover a replicação tal como a aminoacetilação no TYMV.

Vírus de plantas com 3´TLS incluem membros das famílias tymo-, tobamo-, tobra-, bromo-, cucumo-, hordei- e furo-vírus (Goodwin *et al.*, 1998). Um aspecto crucial de mimicar tRNAs é a formação de uma ança cujos resíduos da parte superior (loop) emparelham com nucleótidos exteriores a essa zona. Inerente a este tipo de ança é a sua baixa estabilidade que resulta frequentemente na formação de estruturas alternativas, o que sugere uma função como reguladores moleculares para estas anças (Olsthoorn *et al.*, 1999).

Olsthoorn *et al.* (1999) estudaram o vírus do mosaico da luzerna (AMV) que não possui TLS. Em vez disso, a extremidade 3' organiza-se numa sequência linear de anças (stem-loops) com uma importante afinidade para a proteína da cápsula do AMV. Sob condições fisiológicas o gRNA apresenta-se na conformação secundária. A ligação da CP altera este equilíbrio passando o gRNA a apresentar uma conformação linear. Esta etapa deve ser crucial nos passos do ciclo de replicação que precedem a síntese da cadeia negativa de RNA, estando implicado na protecção da extremidade 3' dos mRNAs víricos da degradação exanucleotídica, indução da tradução dos mRNAs víricos ou no evitar da colisão entre os ribossomas traducionais e as replicases que vão sintetizar a cadeia negativa. A deslocação do RNA vírico para as membranas dos cloroplastos onde os complexos de replicação se associam deve resultar no desprendimento da CP, o que permite a formação das anças 3' terminal e o início da síntese da cadeia negativa. Mais tarde no processo de infecção, as CP recém-sintetizadas competem com as replicases pelos locais de ligação à cadeia positiva. Como a CP é produzida em excesso

relativamente às replicases, RNAs com conformação secundária desaparecem e a síntese de RNA de cadeia negativa pára. Este deve ser o estímulo para começar a síntese assimétrica de RNAs de cadeia positiva.

O processo de síntese de RNA viral é bastante díspar do da maioria das células eucarióticas. Aliás, os vírus de RNA normalmente interrompem a tradução e transcrição celulares não se integrando nestes processos. No entanto, como apresentam um genoma reduzido é-lhes permente subverter factores celulares para os processos de transcrição e tradução virais. Preparações relativamente puras de RdRp de vários vírus podem replicar RNA natural ou sintético *in vitro*, no entanto fazem-no com pouca especificidade. A remoção dos factores celulares da replicase viral resulta invariavelmente na perda ou da actividade da RdRp ou da especificidade relativamente ao RNA a ampliar. A propósito a especificidade RdRp/RNA viral é indubitavelmente um pré-requisito para uma replicação viral bem sucedida, uma vez que a RdRp viral tem que ampliar RNA viral num contexto onde abundam RNAs celulares, a célula infectada (Lai, M., 1998).

Os factores celulares podem participar como reguladores, ligando-se directamente ao RNA, e/ou componentes dos complexos transcricionais ou traducionais. Entre os factores celulares contam-se a tubulina, a actina, factores de transcrição da polimerase III, factores de alongamento da tradução, proteínas ribossomais (Lai, M., 1998).

As proteínas celulares envolvidas na síntese do RNA viral estão associadas ou com o mecanismo de processamento de RNA ou com a maquinaria traducional. É curioso que por exemplo os factores de alongamento da tradução estejam envolvidos na síntese de RNA viral. O vírus não se integra no processo de tradução celular, desviam os factores para a replicação ou expressão do seu genoma (Lai, M., 1998).

Parte destes factores celulares localizam-se predominantemente no núcleo das células normais mas a síntese do RNA viral ocorre exclusivamente no citoplasma. No seu transporte para o núcleo os factores celulares recém-formados devem ser desviados pelos vírus. Outro aspecto digno de nota é o facto de a síntese viral geralmente ocorrer em determinado compartimento celular em cujas imediações não se encontram, nas células normais, os factores celulares (Lai, M., 1998). A associação destas proteínas com o RNA ou a RdRp virais não ocorre acidentalmente mas exige a justaposição dos mecanismos de síntese de RNA viral e de processamento de RNA e tradução celulares. Os vírus subvertem activamente as maquinarias celulares (Lai, M., 1998).

Os factores celulares que se ligam ao RNA viral permitem a aproximação de várias zonas desse RNA, formando os complexos de replicação, transcrição ou tradução. Os complexos RNA/factor celular podem auxiliar a recrutar e estabilizar a RdRp no local de início da síntese de RNA viral. As RdRps não parecem ligar-se directamente aos elementos cis do promotor e a sua capacidade para iniciar a síntese de RNA em locais específicos depende das interacções com os factores celulares que se ligam ao RNA viral. Concluindo, a associação dos complexos mutiproteicos celulares ao RNA viral servem como

ancoradouro facilitando ou estimulando o recrutamento da RdRp para a região do promotor (Lai, M., 1998).

USO DOS VÍRUS COMO VECTORES

Os vectores virais nas plantas demonstraram ser úteis como veículos de expressão para a produção de determinadas proteínas. As plantas, em comparação com os sistemas animais e microbianos, apresentam custos mais baixos e um maior potencial para produção em larga escala.

Os genes estranhos podem ser inseridos permanentemente no genoma de todas as células vegetais, com transmissão à descendência, obtendo-se uma planta transgénica. Existem, ainda uma série de sistemas de expressão transitória. Estes sistemas implicam a utilização de um plasmídio com capacidade de se multiplicar na célula sem se integrar no genoma (utilizado em protoplastos para análise de DNA quimérico) ou a transformação de apenas algumas células ou órgãos da planta (Hawes *et al.*, 2000), por exemplo via injecção de Agrobacteria.

Os sistemas de expressão viral apresentam algumas vantagens sobre os dois últimos como a rapidez na obtenção de resultados, os níveis elevados de produção de proteína heteróloga devido aos fortes promotores virais e à elevada multiplicação do vírus; a infecção viral é sistémica embora algumas células possam não ser infectadas, em particular as reprodutoras; evita procedimentos de transformação morosos (Hawes *et al.*, 2000).

Por outro lado, a transformação para expressão permanente necessita de ser feita apenas uma vez, enquanto que todas as gerações de plantas com expressão transitória necessitam ser transformadas. Os sistemas de expressão virais, caracterizados por o mRNA estranho ser largamente amplificado durante a replicação viral, podem produzir níveis elevados de proteína nas folhas e outros tecidos. Níveis semelhantes em plantas transgénicas não se alcançam, muitas vezes por causa de silenciamento de genes (Shivprasad, 1999). Algumas proteínas estranhas de interesse são fitotóxicas e interferem com o crescimento e desenvolvimento das plantas transgénicas. Nos sistemas virais são as plantas adultas que são inoculadas, reduzindo potenciais problemas de fitotoxicidade. Nestes sistemas a acumulação dos produtos génicos estranhos é relativamente rápida. Duas semanas depois da inoculação podem ser colhidos e a função da proteína avaliada (Shivprasad, S., 1999).

Neste trabalho pretendia-se produzir um vector de expressão transitória tendo por base o PepRSV. Os vectores Tobravirais têm a seu favor o facto de apresentarem sintomas suaves e infectarem largas áreas de células adjacentes (Ratcliff *et al.*, 2001). Outro aspecto fulcral está relacionado com a existência de dois RNAs genómicos. O RNA1

sozinho é responsável pela infecção o que permite a manipulação do RNA2 com o intuito de exprimir genes não virais (MacFarlane *et al.*, 2000). Por outro lado, uma possível limitação dos vírus vegetais como vectores de expressão é a tendência para a delecção de sequências não virais durante a multiplicação do vírus na planta. No entanto, como o RNA2 é dispensável para a infecção sistémica não deverá estar tão sujeito a este fenómeno (MacFarlane *et al.*, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

REACÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA

A reacção de polimerização em cadeia (PCR) consiste em múltiplos ciclos de desnaturação do DNA, emparelhamento dos iniciadores e respectivo al.ongamento com o objectivo de amplificar seqências específicas de DNA. É um processo exponencial visto que os produtos amplificados de um ciclo servem de substrato ao ciclo seguinte. Normalmente, vinte a trinta ciclos de PCR amplificam produto suficiente para ser observado num gel corado com brometo de etídio.

Obtenção de Sequências Nucleotídicas
Construção de Iniciadores

A forma encontrada para obter quantidades trabalháveis das várias sequências nucleotídicas necessárias à montagem dos construções foi a técnica de PCR. Esta técnica permite a inclusão de locais de restrição nos iniciadores e subsequente clonagem por ligação das extremidades coesivas.

Os iniciadores desenhados encontram-se descritos na tabela 1. As sequências utilizadas estão disponíveis na base de dados NCBI cujo endereço electrónico é: *http///www.ncbi.nlm.nih.gov/*.

Tabela 1 – Descrição dos oligonucleótidos iniciadores utilizados para obter as sequências necessárias à montagem dos construções.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Adaptador	Especificidade	Tm
F418*ClaI*	CCATCGATGGTCAACCACGATTTCT CTG	*Cla I*	RNA2 do PepRSV (nucleótido 418 a 435)	66,2
R572:1	TGAGGTACCCATTTTGCGCAGGTGA TTGCA	Cardosina A (*Kpn I*) (nucleótido 1 a 12)	RNA2 do PepRSV (nucleótido 556 a 573)	67,7
F1	ATGGGTACCTGAATCAAAGCA	———	Cardosina A (nucleótido 1 a 21)	67
R1515*ClaI*	CCATCGATGGTCAAGCTGCTTCTGC AAATC	*Cla I*	Cardosina A (nucleótido 1495 a 1515)	67.7
PSKF	TCGATCGATAATTAACCCTCACTAAA AGGG	*Cla I*	Iniciador T3 do pSK (1)	66.4
PSKR2	AAATCGATAACCCCTCGAGGTCGAC GGTAAC	*Cla I*	PSK (nucleótido 628 a 649)	69.5
FGFP	ATGGTAGATCTGACTAGTAAAGGAG	———	mgfp5 (pCAMBIA 1302) (nucleótido 1 a 25)	61,6
RGFP*Xho I*	GCTCGAGTCACACGTGGTGGT	*Xho I*	mgfp5 (pCAMBIA 1302) (nucleótido 744 a 757)	58.8

(1) pSK – plasmídio bpluescript II SK da Novagen
As sequências correspondentes aos adaptadores encontram-se sublinhadas.
A numeração da zona de emparelhamento dos iniciadores com as sequências al.vo está de acordo com a apresentada no NCBI.
Tm – temperatura de emparelhamento

Confirmação da Eficiência de Reacções de Ligação

Fez-se a confirmação da eficiência da reacção de ligação por PCR quando era possível encontrar iniciadores das duas sequências utilizadas na reacção de ligação.

A inserção do local de restrição múltipla do pSK no local *Cla I* do cDNA do RNA2 do PepRSV por sua vez integrado no pT7Blue (*NOVAGENE*) foi demonstrada por PCR sobre a reação de ligação. O iniciador a 5' era complementar do local de restrição múltipla do pSK, pSKF (tabela 1). A 3' recorreu-se a dois iniciadores complementar do cDNA do RNA2 do PepRSV em regiões diferentes: R6 (5'CCTGTCCGTAAGCAGACAA3') é complementar da região a jusante do local de restrição Cla I, do nucleótido 1264 até ao 1283; R3 (5'CGTGATAACGTTCACGGTTG3') é complementar da região mais a jusante do cDNA do RNA2 do PepRSV, do nucleótido 6806 a 6825.

Selecção de Colónias Bacterianas Recombinantes

As colónias, isoladas como resultado da transformação, foram repicadas para reacções de PCR previamente preparadas, mas não sem antes terem sido plaqueadas em pequenos riscados em L-Agar com ampicilina (50 μg:mL de meio). As reacções de PCR provinham do *kit Ready-To-Go™ PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*.

Os iniciadores flanqueavam o fragmento de inserção. No caso da inclusão do local de restrição múltipla do pSK no cDNA do RNA2 do PepRSV integrado no pT7Blue recorreu-se aos iniciadores R6 e F6 (5'TTTGATGATGCGTCCACTG3'). Este último complementar do RNA2 do PepRSV entre os nucleótidos 1021 e 1039.

PCR

A construção e a constituição das reacções de PCR encontram-se descritas na tabela 2. O programa de PCR utilizado para as amplificações encontra-se descrito na tabela 3. Saliente-se que a temperatura de emparelhamento do programa de PCR dependia do Tm do par de iniciadores usados, tendo sido determinada com base na análise comparada da temperatura teórica (ver tabela 1) proposta pelos fornecedores para os diferentes iniciadores. As amplificações foram efectuadas utilizando tubos de PCR 0,20 mL num termociclador *PERKIN – ELMER PCR system 2400*.

Tabela 2 - Resumo da composição básica das reacções de PCR .

Reagente	Volume:tubo	
	Volume final 50 µL	Volume final 25 µL
Tampão de PCR 10x concentrado suplementado com $(NH_4)_2SO_4$ (fornecido com a Taq DNA polimerase da *Fermentas*)	5 µL	2,5 µL
$MgCl_2$ 25 mM da *Fermentas*	3 µL	1,5 µL
Mistura de nucleotídios 10 mM da *GibcoBRL - Life technologies*™	1 µL	0,5 µL
Iniciador a 5' a 20 µM (1)	1 µL	0,5 µL
Iniciador a 3' a 20 µM (1)	1 µL	0,5 µL
DNA - molde	1 - 5 µL	1 - 5 µL
Água esterelizada	completar o volume final	
Elevar a 95ºC durante 3 min; interromper a reacção próximos dos 80ºC o tempo necessário para a adição:		
Taq DNA Polimerase 5U:µL da *Fermentas*	0,5 µL	0,25 µL

(1) Os iniciadores variam de acordo com o objectivo da amplificação.

Tabela 3 - Programa de PCR geral após aplicação da DNA polimerase

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
35 X	94ºC	1 min
	50 a 62ºC (1)	1 min
	72ºC	2 min
1x	72ºC	5 min
1x	4ºC	manter

(1) A temperatura de emparelhamento é definida como um intervalo pois varia de acordo com os iniciadores escolhidos.

Para a realização de reacções de PCR também se recorreu ao *kit Ready-To-Go*™ *PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*. O resumo da composição básica destas reacções de PCR encontra-se representado na tabela 4. O programa utilizado é semelhante ao programa descrito na tabela 3.

Tabela 4 - Resumo da composição básica das reacções de PCR (volume final 25 µL) utilizando o *kit Ready-To-Go*™ *PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*

Reagente	Volume por tubo
Iniciador a 5´a 10 ou 20µM	1 ou 0,5 µL
Iniciador a 3' a 10 ou 20 µM	1 ou 0,5 µL
DNA-molde ou colónia bacteriana	1 a 5 µL ou 1
Água esterilizada	completar o volume final

PCR de Sequências Longas

Foi abordada a estratégia de ampliar a construção pT7Blue com o cDNA do RNA2 do PepRSV integrado onde se poderia ter integrado o local de restrição múltipla do pSK. Para tal recorreu-se ao *kit Expand Long Template PCR System* da Roche. O DNA-molde provinha da reacção de ligação entre o 128 ng da sequência do local de restrição múltipla do pSK e 50 ng cDNA do RNA2 do PepRSV inserido no vector pT7Blue depois da restrição com *Cla I* e inactivação da enzima de restrição a 75º C por 10 min foi constituída ainda por tampão de ligação 5x e Ligase T4 polimerase [2 U (unidades)] da *INVITROGEN*. A reacção foi agitada levemente e incubada cerca de 2 horas à RT (temperatura ambiente). No final procedeu-se à inactivação da enzima a 65ºC durante 10 min.

Os iniciadores emparelhavam com regiões contíguas da construção. O iniciador a 5' foi o pSKF (tabela 1) e a 3' desenhou-se o iniciador RRNA2 (5'TCAAATCAAGGATTAGGTGGAGGT3') completar da região a montante do local *Cla I* do RNA2 do PepRSV do nucleótido 1227 ao 1250 (Tm - 59,3ºC). Como controlo utilizaram-se os iniciadores R6 e F6 descritos acima.

O *kit Expand Long Template PCR System* é composto por uma mistura de enzimas: a *Taq DNA polimerase* e uma polimerase com actividade "proofreading". A constituição das reacções de *Expand Long Template PCR* encontram-se descritas na tabela 5. A preparação de duas "master mix" evita a necessidade de "hot start" e a interacção da mistura de enzimas com os iniciadores ou DNA - molde na ausência de nucleótidos livres. Isto poderia levar à degradação parcial dos iniciadores ou DNA - molde devido à actividade de exonuclease 3' - 5' da polimerase "proofreading".

Tabela 5 - Resumo da composição básica das reacções de *Expand Long Template PCR*.

Componente	Volume	Concentração final
"Master mix 1":		
Água estéril	completar 25 µL	
Mistura de nucleótidos 10 mM cada	1, 75 µL	350 µM
Iniciador 5' (20 µM)	0,5 µL	300 nM
Iniciador 3' (20 µM)	0,5 µL	300 nM
DNA - molde	x	até 10 ng DNA plasmídico
"Master mix 2":		
Água estéril	19,25 µL	
Tampão PCR 10x concentrado suplementado com $MgCl_2$ 17.5 mM	5 µL	1,75 mM
Mistura de enzimas	0,75 µL	2,625 U

As duas "master mix" devem ser colocadas num tubo de PCR 0,20 mL e agitadas num vortex para originar uma solução homogénea imediatamente antes da ampliação. O

programa de *Expand Long Template PCR* utilizado para as amplificações encontra-se descrito na tabela 6.

Tabela 6 - Programa de *Expand Long Template PCR.*

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1 X	92ºC	1 min
10x	92ºC	15 s
	60ºC	30 s
	68ºC	7 min
20x	92ºC	15 s
	60ºC	30 s
	68ºC	7 min*
1x	68ºC	7 min
1x	4ºC	Manter

* o tempo de al.ongamento é acrescido de 15seccada novo ciclo.

"POLISHING" DE PRODUTOS DE PCR

Para promover a eficiência das reacções de ligação procurou-se complementar as extremidades criadas pela *Taq DNA polimerase* durante o PCR socorrendo-se à *Pfu DNA polimerase*. Para preparar a reacção de "polishing" adicionou-se pela seguinte ordem: 10 μL de produto de PCR, 1 μL de mistura de nucleótidos 2.5 mM cada, 1,3 μL de tampão de "polishing" (10x) e 1 μL de *Pfu DNA polimerase* (0.5 U[unidades]). Incubou-se esta reacção a 72ºC durante 30 min num termociclador.

VISUALIZAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Os geles de agarose são obtidos por solidificação desta (0,8 a 1%) fundida em tampão TAE 1x (tampão de corrida de electroforese em gel de agarose obtido por diluição de 1:10 em água destilada de uma solução concentrada 10x TAE constituída por: Tris-base 400 mM, acetato de sódio 200 mM, e EDTA a pH 8,0 20 mM). Adicionou-se brometo de etídio para uma concentração final no gel de 1 μg:mL. Às amostras, antes da aplicação no gel, é adicionado tampão de amostra (50% glicerol, 0,1 % de azul de bromofenol e 100 mM EDTA) que facilita a visualização da corrida e confere densidade aquelas melhorando a sua aplicação. Em alternativa também se adicionou apenas glicerol 87%. A corrida é efectuada em TAE 1x com a potência (amperagem) máxima. A intensidade de corrente (voltagem) aplicada depende do gel (malha e volume), do volume da tina e da amostra a ser visualizada.

As amostras visualizam-se devido à fluorescência do brometo de etídio contra radiação UV (302 nm) produzida por um transiluminador. As imagens dos diferentes geles foram colhidas com uma câmara *Kodak – Electrophoresis documentation and analysis system, 120*.

EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSE

A extracção de DNA do gel foi efectuada com o auxílio do *kit QIAEX II Agarose gel extraction* da *QIAGEN*. As bandas com fluorescência que revelavam a presença de DNA de interesse no gel são rapidamente excisadas e colocadas em microtubos previamente pesados. Determinou-se o peso da porção de gel extraído. As bandas excisadas foram por vezes conservadas a –20ºC.

Para extrair o DNA, adicionaram-se 3 volumes do *tampão QX1* para um volume de gel para fragmentos de DNA entre 100 bp e 4 Kb. Depois de fortemente agitado num vortex adicionaram-se 10 µL do *tampão QIAEX II*. A incubação a 50ºC durante 10 min permite a solubilização completa da agarose e a adsorção do DNA às partículas *QIAEX II*. Agitaram-se os tubos cada 2 min. No final deste período centrifugaram-se durante 30 sec à velocidade máxima (14000 g).

Seguiu-se a lavagem do sedimento com 500 µL do *tampão QX1* com o intuito de remover resíduos de agarose. Posteriormente procedeu-se a duas lavagens com 500 µL *tampão PE* que remove resíduos de sais. Entre as diferentes lavagens foi necessário descartar o sobrenadante o que se conseguiu intercalando-as com centrifugações de 30 sec a 14000 g. No final o sedimento é deixado secar ao ar.

Posteriormente o DNA é recuperado por eluição com 20 µL de Tris-Cl, pH 8,5 10 mM à RT durante 5 minutos. A ascensão do DNA purificado para a parte líquida conseguiu-se por centrifugação durante 30 sec. O sobrenadante é depois transferido cuidadosamente para um novo tubo.

PURIFICAÇÃO DE DNA POR PRECIPITAÇÃO COM ISOPROPANOL

A purificação de DNA consegue-se através da sua precipitação em isopropanol que ocorre na presença de concentrações moderadas de catiões monovalentes. A recuperação do DNA consiste na sua centrifugação e ressuspensão do sedimento em água. Esta técnica é útil para separar fragmentos resultantes de reacções de restrição que possam competir com os fragmentos de inserção durante a reacção de ligação.

Fez-se a diluição de uma reacção de restrição para um volume final de 100 μL com água esterilizada a que se adicionaram 1:10 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de isopropanol. A uma incubação por 10 min a −70ºC seguiu-se uma centrifugação à velocidade máxima também por 10 min. Deixou-se secar o sedimento que se ressuspendeu em 10 a 20 μL de água esterilizada.

CONSTRUÇÃO DE CLONES

Montagem da Construção do Promotor da Proteína da Cápsula do RNA2 do PepRSV:Cardosina A

A sequência do promotor da PC com adaptador a 5' com o local de restrição *Cla I* e adaptador a 3' correspondente aos primeiros doze nucleotídios do cDNA da cardosina A, obtido por PCR foi clonado no plasmídeo pUC19 entre os locais de restrição *Sma I* a 5' e *Kpn I* a 3' (presentes no gene *LacZ*). A reacção de ligação entre 2 μL da preparação de plasmídio de pUC19 e 4 μL do produto de PCR do promotor da PC depois das devidas restrições e inactivação das enzimas de restrição a 75º C por 15 min foi constituída ainda por tampão de ligação 5x e Ligase T4 polimerase [2 U (unidades)] da *INVITROGEN*. A reacção foi agitada levemente e incubada cerca de 16 horas (ON) num banho a 16ºC. Findo este período, procedeu-se à transformação de células competentes de *Escherichia coli*, estirpe DH5α. Fez a confirmação da inserção por preparação de plasmídio das colónias brancas.

Pretendia-se clonar a sequência da cardosina A com adaptador a 5' com o local de restrição *Cla I*, obtido por PCR, no plasmídeo pUC 19 com o promotor da PC inserido, entre os locais de restrição *Kpn I* a 5' e *Ecl136 II* a 3'. A construção seria ampliado por PCR sobre a reacção de ligação.

A construção promotor PC:cardosina A seria posteriormente transferido para o local de restrição *Cla I*, nucleótido 1251, do cDNA do RNA2 do PepRSV. Este cDNA está inserido no plasmídio pT7Blue (*NOVAGEN*) entre os locais de restrição *Nde I* e *BamH I*.

Montagem da Construção do Local de Restrição Múltipla do pSK:mgfp5:promotor da PC do RNA2 do PepRSV

A sequência do local de restrição múltipla do pSK com adaptadores *Cla I* a 5´e a 3´, obtido por PCR, foi clonado no local *Cla I*, nucleótido 1251, do cDNA do RNA2 do PepRSV. O iniciador a 3' al.tera o local de restrição *Cla I* presente no pSK. No local de restrição múltipla do pSK estava inserido um cDNA de uma glutamina sintetase (GS) que apenas serviu para conferir a esta sequência um tamanho aprazível para o trabalho de biologia

molecular. A reacção de ligação entre o 128 ng da sequência do local de restrição múltipla do pSK e 50 ng cDNA do RNA2 do PepRSV inserido no vector pT7Blue depois da restrição com *Cla I* e inactivação da enzima de restrição a 75º C por 10 min foi constituída ainda por tampão de ligação 5x e Ligase T4 polimerase [2 U (unidades)] da *INVITROGEN*. A reacção foi agitada levemente e incubada cerca de 45 min à RT. Findo este período, procedeu-se à transformação de células competentes de *Escherichia coli*, estirpe DH5α, com 2 μL da reacção de ligação (a mesma quantidade utilizada no PCR). Fez-se a confirmação da inserção por preparação de plasmídio de colónias individualizadas.

Pretendia-se incluir a mgfp5 com adaptador a 3' com o local de restrição *Xho I*, obtido por PCR a partir do pCAMBIA 1302, no local de restrição múltipla do pSk já inserido no cDNA do RNA2 do PepRSV inserido no vector pT7Blue entre os locais *EcoR V* e *Xho I*. O local *EcoR V* presente no pT7Blue foi retirado aquando da inserção do cDNA RNA2 do PepRSV. Finalmente inserir-se-ia o promotor da PC com adaptador a 5' com o local de restrição *Not I* e a 3' com o local de restrição *Bgl II*, entre o local *Not I* no pSK e o local *Bgl II* na mgfp5.

Cultura de *Escherichia coli*

As bactérias foram cultivadas em meio *Luria Broth Base* da *GIBCO BRL – Life Technologies*™ (LB) líquido autoclavado, ao qual se adicionou 50 μg de ampicilina por mL de meio em conformidade com os vectores utilizados nos transformantes. Para desenvolvimento, as culturas foram colocadas a 37ºC e em agitação por períodos de cerca de 16 horas.

Para isolamento de colónias procede-se ao plaqueamento das bactérias em *Luria Agar* da *GIBCO BRL – Life Technologies*™ por espalhamento de uma pequena quantidade de cultura sobre o meio. Após crescimento ON a 37ºC, é isolada uma colónia para crescimento em meio líquido.

Preparação de Células Competentes

Para o efeito utilizaram-se as estirpes *DH5α*. Neste processo isolou-se uma colónia bacteriana de um riscado e deixou-se a crescer ON em 2 mL de LB a 37ºC com agitação.

250 μL da cultura bacteriana foram colocados juntamente com 25 mL de LB feito recentemente num tubo "falcon" de 50 mL e incubados a 37ºC com agitação até a suspensão bacteriana apresentar uma densidade óptica a 600 nm entre 0,45 e 0,55 contra um branco constituído por LB. Depois de um rápido arrefecimento da cultura em gelo, centrifuga-se a 1100 *g* durante 5 min.

O sobrenadante foi desprezado e ressuspendeu-se o sedimento em 11 mL de uma solução de $CaCl_2$ arrefecida constituída por glicerol 15% (v:v), PIPES (piperazine-N,N'-bis[2-ethane-sulfonic acid]) 10 mM, pH 7 e $CaCl_2$ 60 mM (os dois últimos reagentes foram esterilizados por autoclavagem). A ressuspensão foi faseada acrescentando-se 1 mL da solução de $CaCl_2$ de cada vez. Esta suspensão foi incubada em gelo por 30 min. Findo este tempo foi centrifugada a 1100 *g* durante 5 min. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as bactérias em 2 mL da solução de cloreto de cálcio descrita acima. Acrescentada 1 mL de cada vez. A suspensão bacteriana obtida é distribuída em al.íquotas de 0,2 mL que se conservam a -70ºC.

Transformação de Células Competentes

As células bacterianas, previamente tornadas competentes, foram descongeladas em gelo. Utilizaram-se 100 μL de bactérias por transformação. Adicionaram-se 2 a 20 μL de reacção de ligação ou 1 a 50 ng de plasmídio às células e agitou-se levemente. Incubou-se em gelo durante 30 min.

Depois da incubação em gelo, sujeitaram-se as bactérias a um choque térmico a 42ºC durante 45 sec. Este choque permitiu a entrada do plasmídio nas células. O controle do tempo, neste passo é crítico. As bactérias foram, então, incubadas em gelo por 2 min.

No final, adicionou-se 0,95 mL de LB e incubaram-se as células a 37ºC com agitação durante uma hora. Plaqueou-se a totalidade da suspensão bacteriana: 100 μL por placa com meio selectivo. Em al.ternativa plaquearam-se 100 μL e o restante foi centrifugado a 3000 *g* durante 4 min por forma a sedimentar as bactérias. Retira-se grande parte do sobrenadante e ressuspende-se as bactérias no restante, plaqueando de seguida.

Quando necessário foi usado um controlo positivo que consistiu numa transformação, feita em paralelo, com 10 ng de DNA *"supercoiled"* de plasmídio intacto. Esta transformação tipicamente origina 105 a 106 colónias.

Isolamento e Crescimento de Recombinantes

Bactérias transformadas com plasmídio, recombinantes ou não, são colocadas a crescer em LB-Agar suplementado com ampicilina (50 μg:mL).

Quando a inserção foi realizada no interior do gene LacZ o meio de isolamento foi ainda acrescido de Blue-gal (μL). As colónias brancas, contendo plasmídio recombinante, foram isoladas e procedeu-se ao seu crescimento em meio líquido. Das suspensões

bacterianas resultantes executou-se preparações de plasmídio que permite a confirmação da inserção de fragmentos nucleotídios e a sua orientação.

A maioria das vezes, como as inserções se realizavam no interior do cDNA do RNA2 não se podia fazer a distinção das bactérias recombinantes por azuis e brancas. Recorreu-se para tal a preparação de plasmídio (ver *Preparação de Plasmídio*) de colónias isoladas e subsequente restrição para verificação da inserção ou a PCR (ver *Selecção de Colónias Bacterianas Recombinantes*) .

Preparação de Plasmídio

O método de isolamento baseia-se no método elaborado por Del Sal *et al.* (1988) no qual se inseriram algumas modificações. Uma colónia individual, contendo plasmídio recombinante, foi inoculada em 10 mL de meio LB com ampicilina (50 μg:mL de meio). Incubou-se ON a 37ºC com agitação. Das suspensões bacterianas resultantes, foram guardadas alíquotas a -70ºC às quais foi adicionado glicerol esterilizado numa concentração final de 15%. Estas culturas servem como reservatório para posteriores utilizações.

Transferiu-se 1,5 mL da cultura para um microtubo de 1,5 mL e centrifugou-se durante 3 min a 14000 g, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento descrito. Ressuspendeu-se o sedimento em 400 μL de tampão STET (8% (p:v) de sacarose; 0,1% de tritonX-100; 50 mM de EDTA; 50 mM de Tris-HCl pH8,0). Colocaram-se 8 μL de lisozima (50 mg:mL) na tampa do microtubo que se inverteu-se depois de fechado. Incubou-se durante 5 min à RT. Após este tempo, estritamente controlado, ferveu-se o conteúdo do tubo durante 45sece centrifugou-se à velocidade máxima durante 10 min. Removeu-se o sedimento com o auxílio de um palito autoclavado e ao sobrenadante foram adicionados 400 μL de isopropanol frio. Agitou-se num *vortex* e centrifugou-se novamente à velocidade máxima durante 10 min. Finda a centrifugação descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento ao ar. Ressuspendeu-se o sedimento em 20 μL de água esterilizada e conservou-se a -20ºC.

Análise de Restrição

Efectuou-se a restrição do DNA plasmídico e dos fragmentos de inserção para a realização dos construções ou para a confirmação do sucesso das várias clonagens. Para a reacção de restrição adicionou-se pela seguinte ordem: água esterilizada (o suficiente para perfazer o volume final), tampão de reacção específico de cada enzima (1x), DNA a restringir (normalmente 1 a 10 μL resultantes de preparação de plasmídio ou PCR) e

enzima de restrição (5 a 10 U [unidades]). A reacção foi incubada a 30ºC ou 37ºC durante duas horas. Por vezes no final da primeira hora adiciona-se mais enzima de restrição. No final, as enzimas foram inactivadas por aquecimento a 65ºC.

"COLONY BLOTTING" E HIBRIDAÇÃO

Levantamento de colónias

Para se proceder ao levantamento das colónias as placas onde estas cresceram foram previamente colocadas cerca de 30 min a 4ºC. No final da técnica foram incubadas a 37ºC para as colónias voltarem a crescer. Discos de membrana *Hybond-N+* de tamanho apropriado para as placas foram dispostos sobre elas de modo a entrarem por completo em contacto com o agar e concomitantemente com as colónias. Para permitir a posterior orientação das membranas em relação às placas fazem-se três furos, com o auxílio de uma agulha estéril, de forma a trespassar a membrana e o LB-agar. Assinala-se na placa o local dos furos. Removem-se cuidadosamente as membranas de cada placa, com uma pinça *forceps*. No decorrer das lavagens é necessário ter o cuidado de conservar a superfície de cantacto com as colónias para cima.

Com o intuito de desnaturar o DNA procedeu-se à disposição das membranas em papel *Whatman* 3MM humedecido com NaOH 0.5 M durante um minuto e subsequente transferência para papel *Whatman* 3MM seco. Depois de secas as membranas são sujeitas a fixação ("cross-linking") através de radiação UV (302 nm) no aparelho *Bio-link satting up* da *VILBER LOURMAT.*

A garantia de que resíduos provenientes das colónias são removidos evitando sinais positivos falsos é fornecida por duas lavagens das membranas num excesso de SSC 5x (cloreto de sódio 3 M e citrato de sódio 0,3 M) durante um minuto, com agitação.

Após estes procedimentos passou-se à fase de hibridação recorrendo-se ao *kit ECL Random prime labelling and detection systems, version II* da *AMERSHAM LIFE SCIENCE*. O sistema permite a marcação de ácidos nucleicos, hibridação e detecção de colónias tendo como técnicas base a detecção melhorada de quimioiluminescência e a marcação de DNA com iniciadores pouco específicos.

Marcação da sonda

Foi preparada uma diluição em água esterilizada para um volume final de 30 μL em que a sequência nucleotídica que se pertendia inserir no plasmídio com que se transformou as bactérias ficou a uma concentração de 25 ng:μL. O DNA foi desnaturado

em água fervente por 5 min, tendo sido, no final, de imediato colocado em gelo. A reacção consistiu na mistura dos seguintes reagentes pela ordem indicada: 30 μL de água, 10 μL da mistura de nucleótidos, 5 μL da mistura de iniciadores, 4 μL do DNA desnaturado e 1 μL de enzima Klenow (5 U [unidades]). Os reagentes, excepto a enzima, foram previamente congelados em gelo. A reacção foi incubada num banho a 37ºC por uma hora e armazenada por um período de tempo curto a 4ºC.

Hibridação e Lavagens

A membrana foi pré-hibridada a 60ºC (pretendia-se uma especificidade elevada) durante 30 min com tampão de hibridação (SSC 5x, 0,1% (p:v) de sulfato de dextrana, líquido de bloqueio 20x diluídop e 100 μg:mL de DNA heterólogo de esperma de salmão desnaturado em água fervente durante 5 min) previamente aquecido à temperatura de pré-hibridação com constante agitação suave. Findo este período, adicionou-se a sonda marcada que entretanto havia sido fervida durante 5 min e arrefecida em gelo. A hibridação ocorreu ON a 60ºC com agitação suave.

A primeira lavagem do excesso de sonda efectuou-se com uma solução constituída por SSC 1x e SDS 0,1 % (p:v), pré-aquecida a 60ºC, durante 15 minutos com agitação suave. A solução utilizada para a segunda lavagem diferia da primeira na concentração de SSC que era apenas metade. A segunda lavagem também ocorreu a 60ºC durante 15 min com agitração suave.

Bloqueio, incubação com anticorpo e lavagens

A membrana foi transferida para um novo recipiente e esteve a incubar durante 1 minuto em tampão A (Tris-HCl 100 mM; NaCl 600 mM, pH 7,5). Substituiu-se este tampão por uma nova solução constituída por um líquido de bloqueio 20x diluído em tampão A e incubou-se a membrana durante 30 minutos à RT. O passo seguinte resumiu-se à incubação das membranas durante outros 30 minutos no conjugado anti-fluoresceína HRP 1000x diluído em leite em pó 0,5%(p:v) preparado de fresco em tampão A. A última lavagem em Tween™-20 0,1% (v:v) em tampão A, decorreu em três etapas, as duas primeiras tiveram a duração de 15 min cada e a última teve a duração de 30 min.

Produção de sinal e detecção

Incubaram-se as membranas em volumes iguais de solução de detecção A e solucção de detecção B durante 1 minuto à RT. Retirou-se o excesso de reagente de

detecção tendo o cuidado de eliminar qualquer bolha de ar que eventualmente se tivesse formado e procedeu-se à detecção do sinal. A membrana coberta com uma película aderente, no interior da cassete autorradiográfica, foi exposta a um filme *Agfa Ortho CP-6-Plus* que foi revelado numa máquina *Kodak X-OMAT M43 Processor.* O tempo de exposição dependeu da intensidade do sinal.

Reaproveitamento da membrana

A membrana pode ser novamente reutilizada para posteriores marcações, retirando completamente a sonda por fervura numa solução de SDS 0,5 %. Quando esta solução levantou fervura, adicionou-se a membrana e desligou-se o sistema de aquecimento. A membrana permaneceu mergulhada na solução até arrefecer. Após o arrefecimento da solução, a membrana húmida foi guardada a -20ºC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CONSTRUÇÃO DE CLONES

Os Tobravírus possuem um conjunto de características que os tornam atractivos como vectores de expressão génica. O RNA viral mais pequeno, RNA2, é dispensável à infecção sistémica das plantas, o que significa que pode ser manipulado sem afectar a viabilidade do vírus. O promotor do gene do sgRNA da proteína da cápsula pode ser duplicado, permitindo a produção de construções relativamente estáveis com promotores adicionais. Isto levanta a possibilidade da formação de construções que expressem proteínas não virais. Neste trabalho utilizou-se como cDNA estranho o de cardosina A e o de GFP. A cardosina A é uma proteinase aspártica abundante nos pistilos de *Cynara cardunculus* L. que é tradicionalmente explorado na manufactura de queijo. A cardosina A está provavelmente envolvida nas interacções pólen: pistilo e na defesa contra patogénios (Faro *et al.*, 1999). A GFP da medusa bioluminescente *Aequorea victoria* tornou-se uma molécula repórter "standard" utilizada em muitos sistemas biológicos (Davis, S. *et al.*, 1998), pois permite a visualização directa da expressão do gene e a localização subcelular de proteínas de fusão em células vivas. Pode ser observada sem o recurso a técnicas invasivas ou adição de cofactores.

DESENHO DO PROMOTOR DA PROTEÍNA DA CÁPSULA

O objectivo deste trabalho era delimitar o promotor para o gene a inserir no RNA2 do PepRSV. Este tinha de incluir todos os motivos necessários à sua expressão, tendo-se escolhido duplicar o promotor da PC deste vírus. A caracterização deste promotor não está documentada.

ugugaaaucaaccacgauuucucugguucaacaaguuucuuguuguaag ccaucacacuuuuguguaaugg au gcaua auuauacugauugugcgauuuuaaauaucauuauuauaagauuuugccuugcugauccaccgguugcugcaaucaccugcgcaaa aug

Figura 5 – Sequência (163 bp) delimitada como promotor da proteína da cápsula. Estão sombreadas as zonas correspondentes à estrutura secundária a montante do local GCAUA (22 bp), o local GCAUA e o local ATG activo; sublinhada a zona superior da ança.

A pesquisa bibliográfica (ver *INTRODUÇÃO)* sobre os promotores da PC dos Tobravírus relata a existência do motivo GCAUA em todos os promotores subgenómicos dos Tobravírus, iniciando-se a ORF sob domínio do promotor no codão ATG mais próximo a jusante. No caso do PepRSV o codão ATG distancia-se em 98 bp do motivo CGAUA (figura 5).

Foi ainda descrita (Goulden *et al.*, 1991) a existência de uma estrutura secundária a montante deste motivo conservada em tamanho. Esta estrutura é constituída por 18 bp no pé e 4 bp na parte superior. Neste trabalho, verificou-se que no PepRSV esta situação se

repete. A posição e permanência desta estrutura secundária é verificada em várias simulações em computador (figura 6 e 7). A simulação da formação de estruturas secundárias pelo RNA2 dos Tobravírus foi feita em computador recorrendo a um programa informático disponível em http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/.

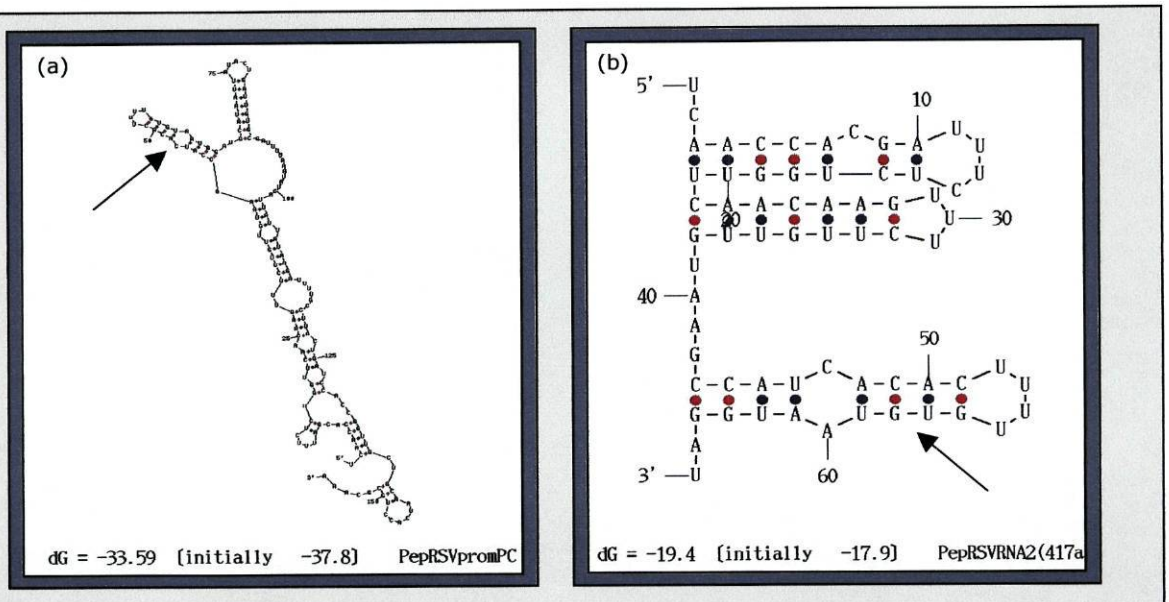


Figura 6 – Simulação em computador da estrutura secundária da região a montante da ORF da PC do RNA2 do PepRSV. Na representação (a) temos a região seleccionada como promotor da PC no PepRSV (nº de acesso NCBI: X03241). Na representação (b) temos a região do promotor da PC a montante do motivo GCAUA. Em ambas as representações surge a ança (setas) prevista pela literatura e na mesma localização.

Foi necessário definir o tamanho aproximado da sequência a duplicar. Para tal procedeu-se à comparação com os promotores desenhados por MacFarlane *et al.* (2000) para o TRV e o PEBV. Estes promotores tinham um tamanho de 210 bp, 81 bp a montante do motivo CGAUA, no caso do TRV, e 316 bp, 124 bp a montante do motivo CGAUA, no caso do PEBV. Estes valores davam uma referência relativa do tamanho dos promotores da PC em Tobravírus.

Procedeu-se, em seguida, a várias simulações em computador introduzindo variações no tamanho da sequência a montante do motivo CGAUA do RNA2 do PepRSV. É de notar a consistência de uma segunda estrutura secundária, para além da documentada na bibliografia, a montante do motivo GCAUA que ocorre na mesma posição nas três situações apresentadas (figura 6 e 7). Esta outra estrutura secundária pode ter algum papel na transcrição do sgRNA sob domínio do promotor. O facto de estas estruturas secundárias

aparecerem nas várias simulações executadas pode ser um indício da estrutura secundária real do vírus.

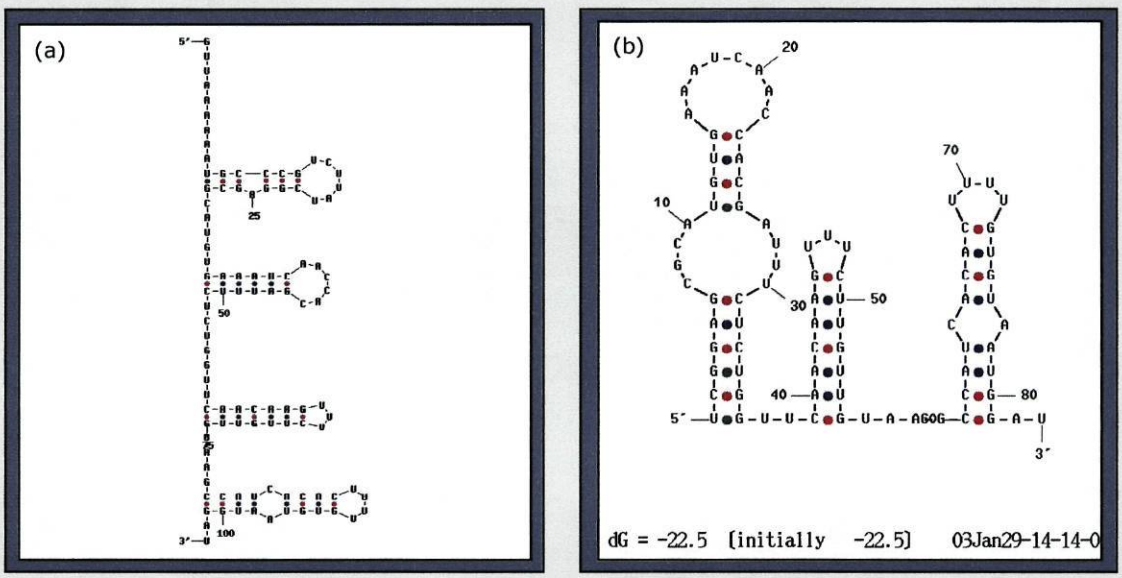


Figura 7 – Simulação em computador da estrutura secundária da região a montante da ORF da PC do RNA2 do PepRSV. Na representação (a) temos a região de 103 bp a montante do motivo CGAUA da sequência seleccionada como promotor da PC no PepRSV (nº de acesso NCBI: X03241). Na representação (b) temos a região do promotor da PC 83 bp a montante do motivo GCAUA. Em ambas as representações surge a ança prevista pela literatura e na mesma localização. A seta a tracejado aponta uma segunda estrutura secundária comum às sequências a montante do motivo GCAUA experimentadas.

Escolheu-se a sequência de menor tamanho em que esta segunda estrutura secundária estava presente, embora permitindo que ocorresse pelo menos mais uma estrutura secundária, por comparação com os promotores do PEBV e TRV analisados por MacFarlane *et al.* (2000) (figura 8 e 9). Outro aspecto ponderado para não reduzir esta região a menos dos 66 bp foi a semelhança da zona superior da ança destas estruturas secundárias.

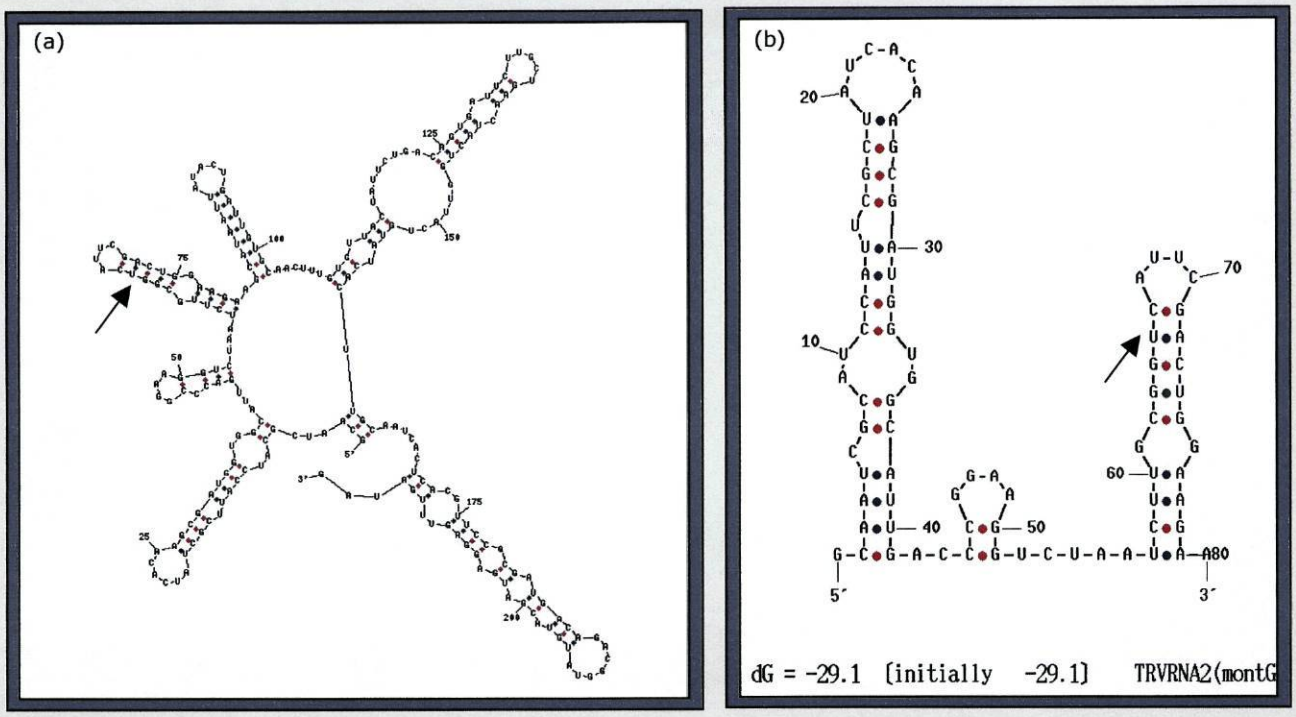


Figura 8 - Simulação em computador de estrutura secundária da região a montante da ORF da PC do TRV. Na representação (a) temos a região definida por MacFarlane *et al.* (2000) como promotor da PC no TRV (nº de acesso NCBI: AJ009833). Na representação (b) temos a região do promotor da PC a montante do motivo GCAUA. Em ambas as representações surge a ança prevista pela literatura e na mesma localização.

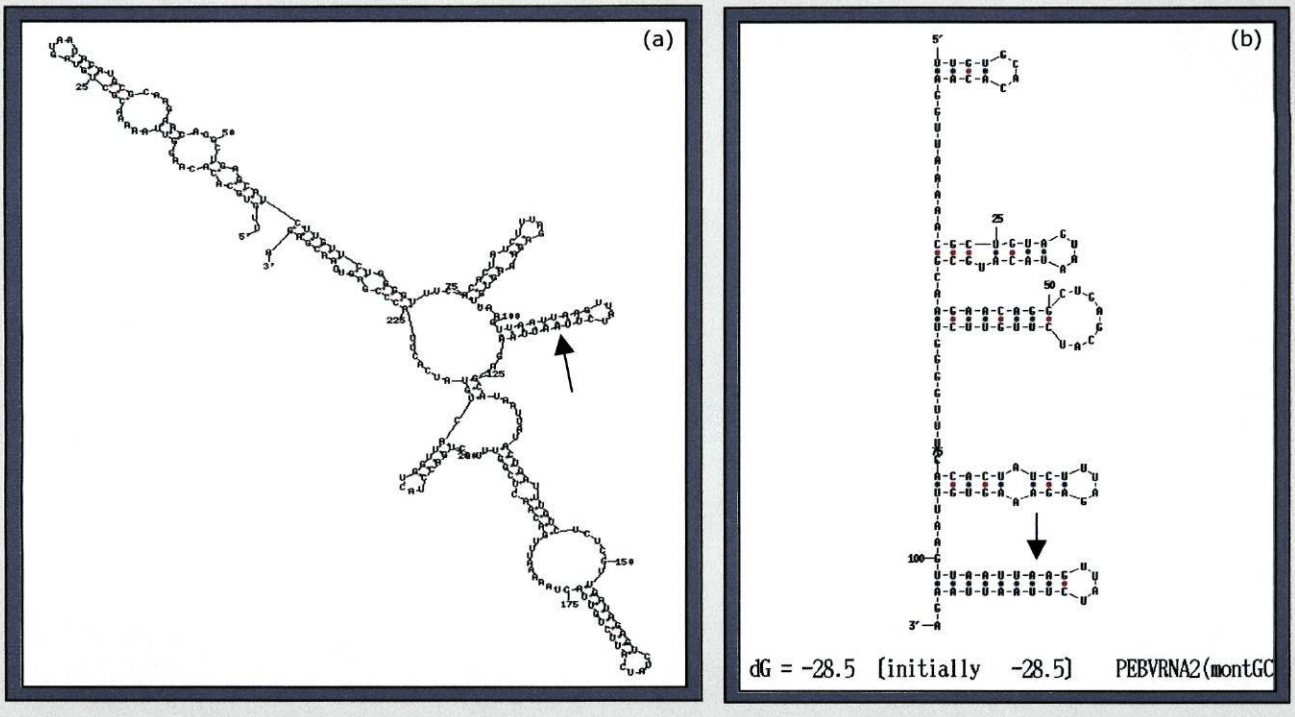


Figura 9 - Simulação em computador da estrutura secundária da região a montante da ORF da PC. Na representação (a) temos a região definida por MacFarlane *et al.* (2000) como promotor da PC no PEBV (nº de acesso NCBI: X78455). Na representação (b) temos a região do promotor da PC a montante do motivo GCAUA. Em ambas as representações surge a ança prevista pela literatura e na mesma localização.

Assim, duplicou-se a região de 155 bp a montante da ORF da proteína da cápsula do PepRSV com o intuito de a inserir a jusante do gene da PC no RNA2. No decorrer deste trabalho denominar-se-á esta região como promotor da PC do PepRSV.

O promotores subgenómicos têm duas funções: (i) recrutar a RdRp; (ii) promover a síntese do sgRNA a partir de um nucleótido inicial determinado (Miller *et al.*, 2000). Entre os elementos de recrutamento da replicase encontram-se sequências específicas da sequência do promotor e as estruturas secundárias que constituem o promotor.

Estes autores tiveram o cuidado adicional de não inserirem promotores da mesma espécie nos seus vectores para evitar fenómenos de recombinação, o que neste trabalho não foi possível.

Ainda, reportando ao trabalho de MacFarlane *et al.* (2000) adoptou-se como zona de inserção, do promotor da PC do PepRSV, o local de restrição *Cla I* a jusante do gene da PC. Esta escolha é justificada pela biologia molecular dos vírus (ver figura 10).

A expressão da proteína da cápsula dos Tobravírus é conseguida por intermédio da produção de um sgRNA. Com um promotor igual ao da proteína da cápsula a proteína heteróloga será produzida de forma semelhante. Apesar da existência de outros modelos para a síntese de sgRNAs considera-se que aos Tobravírus se aplica o modelo mais vastamente reconhecido para este fenómeno: o início da transcrição no interior de moléculas de RNA negativas complementares da cadeia genómica positiva. Esta opção baseia-se no facto da proximidade taxonómica dos Tobravírus relativamente aos Hordeiovírus que apresentam uma síntese de sgRNAs deste tipo. No caso de moléculas de RNA positivas que produzem vários sgRNAs aqueles que se localizam a 3´da cadeia positiva, tendem a ser os mais abundantes. O RNA2 do PepRSV passaria a ser uma destas moléculas, com mais de um ORF a codificar sgRNAs (ver *INTRODUÇÃO*). Logo, a proteína mais produzida será a heteróloga. Acrescente-se ainda que não é afectada a infecção sistémica das plantas pelo vírus: a proteína da cápsula é necessária à infecção de novas plantas por parte de nemátodos.

Outro argumento a favor da introdução da sequência heteróloga a 3' da ORF da PC na cadeia positiva prende-se com o facto de que a presença de um promotor activo no final da ORF da PC (na cadeia negativa) pode provocar a finalização prematura de sgRNAs da PC. O promotor duplicado pode funcionar como elemento de terminação, ou a presença de um complexo de transcrição neste local leva à paragem da replicase aumentando a probabilidade da sua dissociação da cadeia genómica negativa. Normalmente a extremidade 5' da cadeia negativa, embora não pertencendo à ORF da PC, está presente no sgRNA desta podendo ter um papel importante na sua tradução. O sgRNA da proteína heteróloga possui a extremidade 5´da cadeia negativa e está sujeito à sua acção.

O sgRNA da PC passa a possuir uma sequência correspondente à do fragmento heterólogo. O que não traz problemas visto a tradução terminar no fim da ORF da PC. Pela mesma razão é necessário que as sequências heterólogas a introduzir possuam codão de terminação. Caso contrário, obter-se-ia uma proteína de fusão com a extremidade 3' da cadeia positiva do RNA2 do PepRSV.

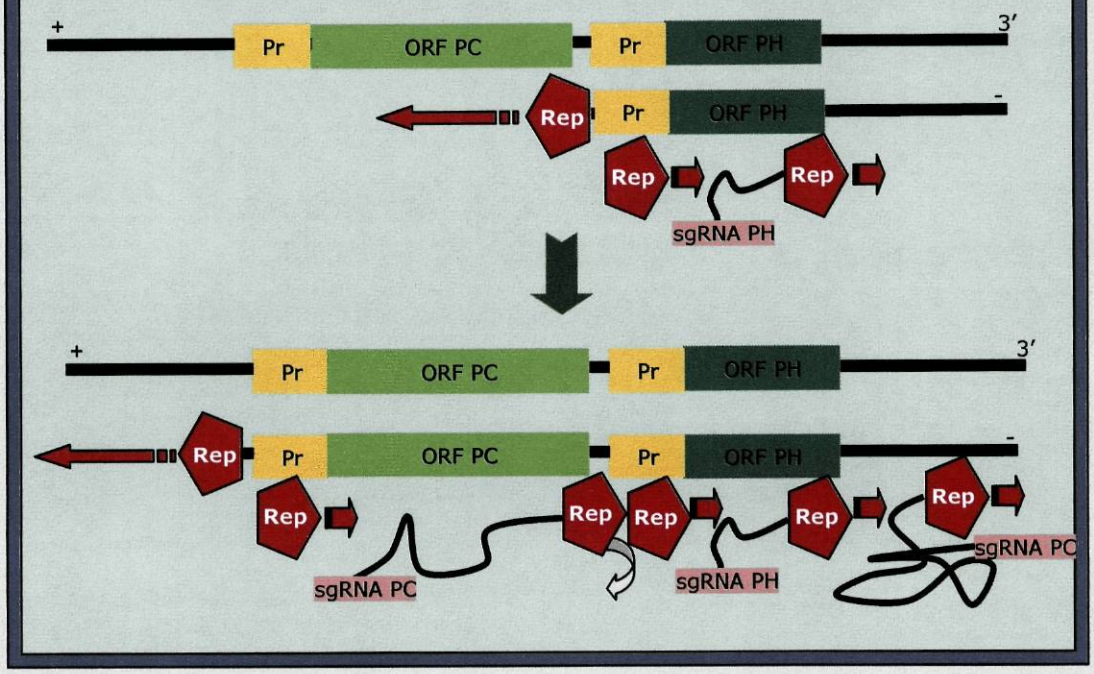


Figura 10 - Esquema da hipotética síntese de sgRNAs do RNA2 quimérico do PepRSV. Mal a cadeia negativa do RNA2 tem tamanho suficiente para expor o promotor da proteína heteróloga os sgRNAs desta começam a ser sintetizados. Só mais tarde os sgRNAs da PC podem ser sintetizados. Por outro lado, devido à presença de um promotor activo a montante da ORF da PC (na cadeia negativa) de um outro promotor pode provocar a finalização prematura de sgRNAs da PC. + - cadeia genómica de RNA positiva; - – cadeia genómica de RNA negativa; Pr – promotor; ORF – grelha de leitura; PC – proteína da cápsula; PH – proteína heteróloga; Rep – replicase; sgRNA – RNA subgenómico.

MONTAGEM DA CONSTRUÇÃO PROMOTOR DA PC DO RNA2 DO PepRSV:CARDOSINA A

Esta estratégia compreendeu um passo inicial de produção dos fragmentos da construção com adaptadores que permitissem a sua ligação orientada. O desenho dos iniciadores não permitiu grande flexibilidade visto ser necessário a homologia com as extremidades dos cDNAs da cardosina A e do promotor da PC. No entanto, procurou-se

respeitar a % de GC inferior a 50% e Tms aproximados para pares de iniciadores utilizados em conjunto.

A reacção de PCR para a obtenção de cDNA de cardosina A com adaptador *Cla* I leva à produção, para além do fragmento esperado, de um amplificado inespecífico de 900 bp devido a homologia parcial com o iniciador a 3' utilizado (ver figura 11).

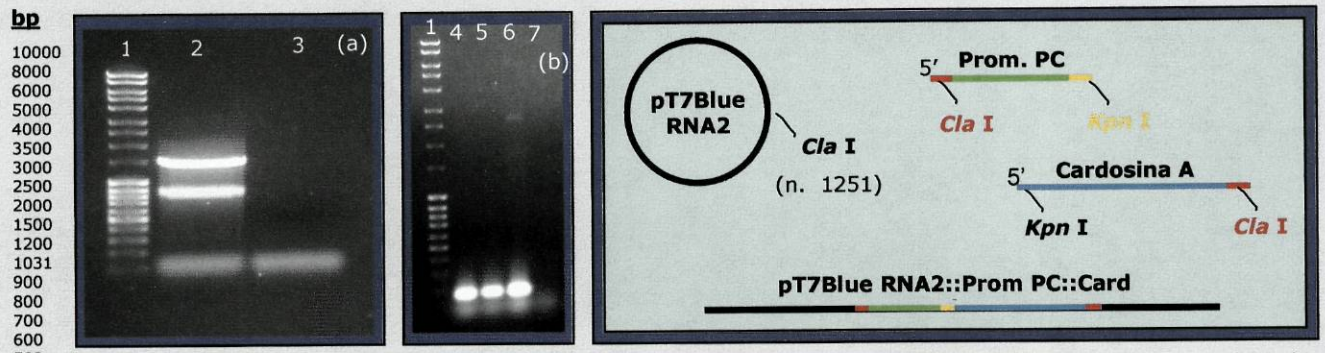


Figura 11 – Fotografia de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio (a) representando o produto de PCR de cDNA de cardosina A com iniciadores F1 e R1515*Cla*I (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). Este conjunto de iniciadores produz dois fragmentos devido a uma homolgia parcial entre o iniciador R1515*Cla*I e a região a 900 bp da cardosina A. (b) gel representando o produto de PCR do promotor da PC do RNA2 com iniciadores F418*Cla*I e R572:1 (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). 1 – Generuler™ DNA Ladder Mix da *FERMENTAS* (marcador de pesos moleculares); 2 – produto de PCR de cDNA de cardosina A; 3 – reacção de PCR controlo realizada sem DNA; 4 a 6 - produto de PCR de cDNA de RNA2 do PepRSV; 7 - reacção de PCR controlo realizada sem DNA. Ao lado encontra-se a lista do tamanho das bandas do marcador.

Uma dificuldade deste trabalho foi seleccionar os vários recombinantes produzidos pelo facto de se pertender inserir os vários cDNAs no interior do RNA2 do PepRSv, onde, como é óbvio, não existia nenhum gene de selecção. Uma das tentativas foi construir o cDNA quimérico promotor da PC:cardosina A no pUC19 e transferi-lo posteriormente para o local *Cla*I do RNA2 do PepRSV. A introdução do promotor da PC no pUC19 foi de fácil rastreio visto ter sido inserido no interior do gene *LacZ*. As bactérias recombinantes perderam a capacidade de produzir a β-galactosidase e consequentemente não degradam o X-Gal apresentando a cor branca. No entanto, quando se fez a análise de restrição destas colónias verificou-se a existência de falsos positivos (ver figura 12).

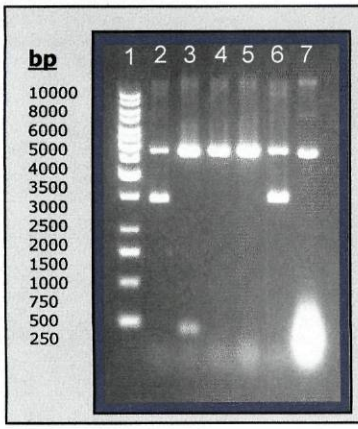


Figura 12 – Fotografia de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio, representando a análise de restrição realizada com os clones positivos para o promotor da PC. A digestão com *Sma*I e *Xba*I de pUC19 recombinante produz um fragmento de 2690 bp e outro de 200 bp, o que apenas ocorreu no clone da pista 3. A banda mais pequena observada na pista 1 e 5 provavelmente corresponde a pUC19 não cortado. 1 - Generuler™ 1 Kb DNA Ladder da *FERMENTAS* (marcador de pesos moleculares); 2 a 6 – análise de restrição de plasmídio das colónias brancas; 7 – análise de restrição semelhante à das outras pistas de plasmídio de pUC19 (controlo). Ao lado encontra-se a lista do tamanho das bandas do marcador.

Depois da selecção e confirmação do clone recombinante, que se passará a representar como pUC19:promotor PC, foi necessário acoplar o cDNA da cardosina A ao promotor da PC. A existência do local de restrição *Kpn*I a 5' da cardosina A foi aproveitado para criar o adaptador a 3' do promotor da PC. No entanto, a restrição com *Kpn*I perto da extremidade 3' não é muito eficiente. O cDNA de cardosina A cortado de forma deficiente deve ter sido a principal causa do insucesso na ligação do pUC19:promotor PC à cardosina A. Para tentar aumentar a eficiência desta restrição tentou-se um tratamento com *Pfu* que tornaria a extremidade a 3' a direito onde a *Kpn*I se poderia ligar mas igualmente sem sucesso.

MONTAGEM DA CONSTRUÇÃO DO LOCAL DE RESTRIÇÃO MÚLTIPLA (L.R.M.) DO pSK:PROMOTOR DA PC:mgfp5

Como intuito de facilitar a selecção dos construções quiméricos que se pretendiam inserir no interior do RNA2 do PepRSV inseriu-se um L.R.M. do pSK com o intuito de promover um conjunto alargado de locais de restrição para a inserção de sequências heterólogas, para além de permitir a análise de restrição das preparações de plasmídio provenientes das colónias resultantes de transformação com reacção de ligação. O L.R.M. do pSK deveria ser inserido no local *Cla*I do RNA2 do PepRSV.

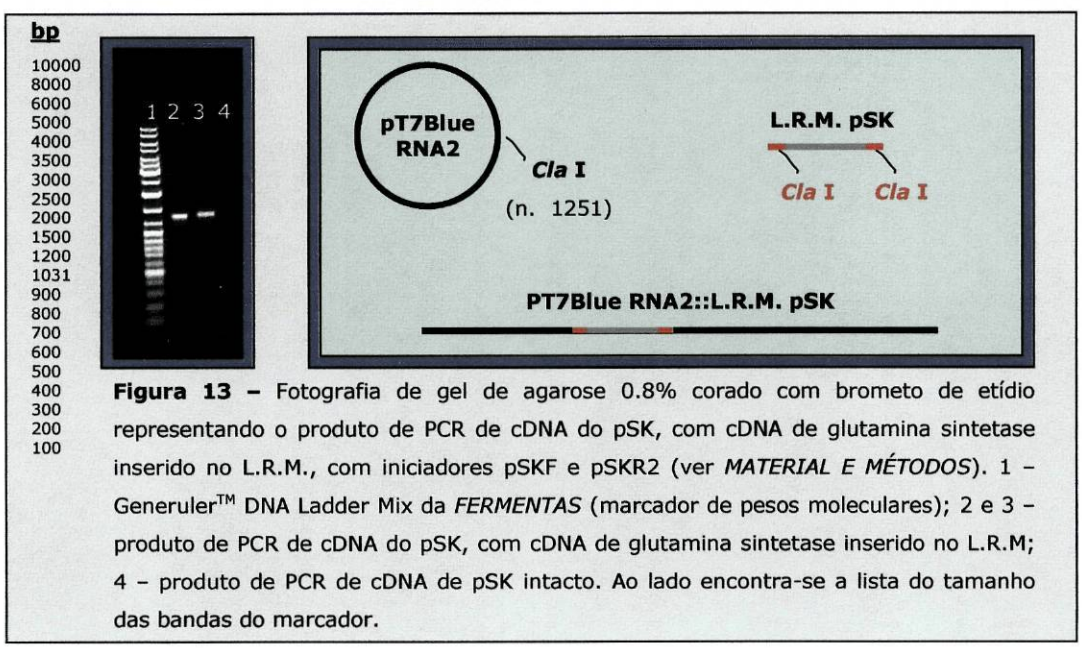


Figura 13 – Fotografia de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio representando o produto de PCR de cDNA do pSK, com cDNA de glutamina sintetase inserido no L.R.M., com iniciadores pSKF e pSKR2 (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). 1 – Generuler™ DNA Ladder Mix da *FERMENTAS* (marcador de pesos moleculares); 2 e 3 – produto de PCR de cDNA do pSK, com cDNA de glutamina sintetase inserido no L.R.M; 4 – produto de PCR de cDNA de pSK intacto. Ao lado encontra-se a lista do tamanho das bandas do marcador.

O L.R.M. do pSK constitui um fragmento de dimensões reduzidas difícil de ampliar por PCR. Sendo assim, optou-se por realizar a reacção de PCR de cDNA de um plasmídio pSK em que previamente se tinha inserido um cDNA de glutamina sintetase (ver figura 13).

Após a reacção de ligação entre o L.R.M. do pSK e o RNA 2 inserido no plasmídio pT7Blue decidiu-se confirmar a existência de construções por PCR recorrendo ao iniciador 5' do fragmento de inserção e a dois iniciadores 3' do RNA2. Os fragmentos ampliados por PCR correspondem aos tamanhos esperados, o que indica que o L.R.M. do pSK se encontra no interior do RNA2 (ver figura 14).



Figura 14 – Fotografia de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio. Gel representando o produto de PCR de cDNA da reacção de ligação do pT7Blue:RNA2 com o L.R.M. do pSK com iniciadores pSKF e R3 e R6 (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). 1 – HyperLadder; 2 – produto de PCR com os iniciadores pSKF e R3 da reacção de ligação; 3 - produto de PCR com os iniciadores pSKF e R6 da reacção de ligação; 4 - produto de PCR com os iniciadores pSKF e R3 do pT7Blue:RNA2; 5 - produto de PCR com os iniciadores pSKF e R6 do pT7Blue:RNA2. Ao lado encontra-se a lista do tamanho das bandas do marcador.

A confirmação fornecida pelo PCR de cDNA de a reacção de ligação levou ao delinear de três estratégias para clonar o plasmídio pT7Blue:RNA2:L.R.M. recombinante.

A primeira dessas estratégias consistiu na ampliação do plasmídio na sua totalidade através de uma reacção de PCR de sequências longas. O plasmídio quimérico não era de um tamanho exagerado portanto com dois iniciadores contínuos, em sentido contrário, poderia ser ampliado por este método, religado e transformado em bactérias. Provavelmente este método não funcionou por se ter realizado sobre uma mistura de DNA muito pouco pura, a reacção de ligação. Este é al.iás um dos problemas posto pela empresa que comercializa o Kit utilizado para o insucesso da reacção.

A segunda estratégia consistiu em transformar bactérias com a mesmo volume de reacção de ligação utilizado no PCR de confirmação e enveredar por "colony blotting" e hibridação. Obtiveram-se muitos falsos positivos sobre os quais se executou análise de restrição das preparações de plasmídio que no entanto foram infrutíferas. Provavelmente a temperatura de hibridação utilizada foi demasiado baixa, permitindo homologias pouco específicas nos falsos positivos. A sonda utilizada era direccionada à glutamina sintetase inserida no L.R.M. do pSK.

A terceira via correspondeu à realização de um PCR de cDNA das colónias transformadas com a construção quimérica. Os iniciadores escolhidos localizam-se no RNA2

próximos do local *Cla*I, portanto, flanqueiam o possível fragmento de inserção. Também aqui não foi detectado nenhum clone positivo, mas este facto deve-se provavelmente a uma deficiente repicagem das colónias. Esta estratégia é a que mais facilmente pode permitir a detecção de um clone positivo.

Ainda se iniciou esta montagem com o desenho dos iniciadores e ampliação do cDNA da GFP. O esquema básico da construção aproveitou um local de restrição a 5' no cDNA da GFP (local *Bgl* II) para construir o adaptador 3' do promotor. Os adaptadores a 5' do promotor da PC e 3' da GFP eram coincidentes com locais de restrição do L.R.M. do pSK.

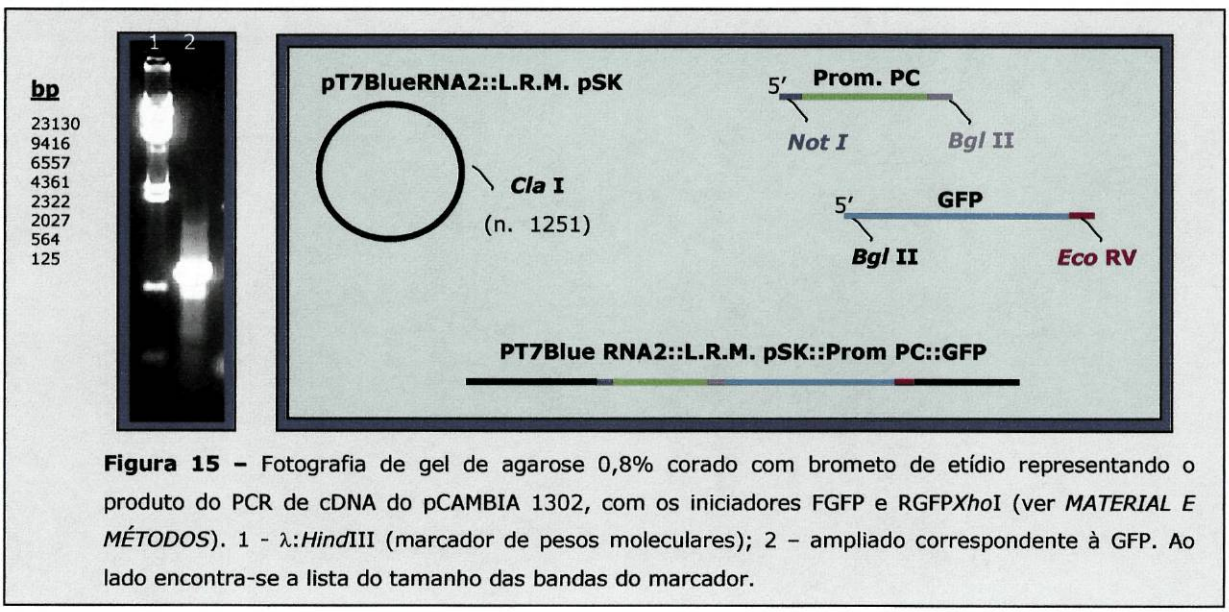


Figura 15 – Fotografia de gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio representando o produto do PCR de cDNA do pCAMBIA 1302, com os iniciadores FGFP e RGFP*Xho*I (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). 1 - λ:*Hind*III (marcador de pesos moleculares); 2 – ampliado correspondente à GFP. Ao lado encontra-se a lista do tamanho das bandas do marcador.

Este trabalho disponibiliza por um lado um L.M.R. no interior do RNA2 no PepRSV e por outro um promotor vírico para expressão de uma sequência heteróloga inserido no L.R.M. de um plasmídio de fácil manipulação laboratorial, pUC19. Permite uma variedade de montagens para uma futura utilização do PepRSV como vector de expressão em plantas. De qualquer maneira isto só será possível quando for recuperado o RNA1 do vírus, essencial à infecção vírica.

BIBLIOGRAFIA

Barton, D., Morasco, B., Flanegan, J. (1999). Translating ribossomes inhibit Poliovirus negative strand RNA synthesis. *Journal of Virology*. 73, pp. 10104 – 10112.

Chen, M.-H., Roossinck, M. J., Kao, C. C. (2000). Efficient and specific initiation of subgenomic RNA synthesis by cucumber mosaic virus replicase in vitro requires an upstream RNA stem-loop. *Journal of Virology*. 74, pp. 11201 – 11209.

Del Sal G., Manfioletti, G., Schneider, C. (1988). A one – tube plasmid DNA mini – preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research.* Vol. 16, pp. 9878.

Dreher, T. W. , Tsai, C.-H. e Skuzeski, J. M. (1996). Aminoacylation identity switch of turnip yellow mosaic virus RNA from valine to methionine results in an infectious virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, pp. 12212-12216.

Faro, C., Ramalho-Santos, M., Vieira, M., Mendes, A., Simões, I., Andrade, R., Veríssimo, P., Lin, X.-L., Tang, J., Pires, E. (1999). Cloning and characterization of cDNA encoding Cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 274, pp. 28724 – 28729.

Filichkin, S., Bransom, K., Goodwin, J., Dreher, T. (2000). The infectivity of turnip yellow mosaic virus genomes with altered tRNA mimicry are not dependent on compensating mutations in the viral replication protein. *Journal of Virology*. 74, pp. 8368 – 8375.

Giegé, R. (1996). Interplay of tRNA-like structures from plant viral RNAs with partners of the translation and replication machineries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, pp. 12078 – 12081.

Goulden, M. G., Lomonossoff, G. P., Davies, J. W., Wood, K. R. (1990). The complete nucleotide sequence of PEBV RNA2 reveals the presence of a novel open reading frame and provides insights into the structure of tobraviral subgenomic promotors. *Nucleic Acids Research*. 18, pp. 4507 – 4512.

Hawes, C., Boevink, P., Moore, I. (2000). Protein localization by fluorescence microscopy. A pratical approach. Edited by . Allan, V. Oxford University Press

Koev, G., Miller, W. A., (2000). A positive strand RNA virus with three very different subgenomic RNA promotors. *Journal of Virology.* 74, pp. 5988 – 5996.

Koev, G., Mohan, B., Miller, W. (1999). Primary and secondary structural elements required for synthesis of barley yellow dwarf virus subgenomic RNA1. *Journal of Virology*. 73, pp. 2876 – 2885.

Lai, M. (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes: a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology*. 244, pp. 1 – 12.

MacFarlane, S. A. (1999). Molecular biology of the tobraviruses. *Journal of General Virology.* 80, pp. 2799 – 2807.

MacFarlane, S. A., Popovich, A. H. (2000). Efficient expression of foreign proteins in roots from Tobravirus vectors. *Virology*. 267, pp. 29 – 35.

Miller, W., Dreher, T., Hall, T. (1985). Synthesis of brome mosaic virus subgenomic RNA *in vitro* by internal initiation on (-) sense genomic RNA. *Nature.* 313, pp. 68- 70.

Miller, W. A., Koev, G. (2000). Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology*. 273, pp. 1 – 8.

Mueller, A. M., Mooney, A. L., MacFarlane, S. (1997). Replication of *in vitro* tobravirus recombinants shows that the specificity of template recognition is determined by 5′ non-coding but not 3′ non coding sequences. *Journal of General Virology*. 78, pp. 2085 – 2088.

Nagy, P. D., Pogany, J., Simon, A. E. (1999). RNA elements required for RNA recombination function as replication enhancers *in vitro* and *in vivo* in a plus-strand RNA virus. *The EMBO Journal.* 18, pp. 5653 – 5665.

Nagy, P. D., Zhang, C., Simon, A. E. (1998). Dissecting RNA recombination *in vitro*: role of RNA sequences and the viral replicase. *The EMBO Journal.*17, pp. 2392 – 2403.

Olsthoorn, R., Mertens, S., Brederode, F., Bol, J. (1999). A conformational switch at the 3′ end of a plant virus RNA regulates viral replication. *The EMBO Journal.* 18, pp. 4856 – 4864.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez,A. , Baulcombe, D. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal.* 25, pp. 237 – 245.

Santos, G. (2002). Isolamento e caracterização de cDNAs de superóxido dismutase de *Solanum tuberosum* L. Trabalho de estágio científico do curso de Biologia - Ramo Científico.

Santos, J. (2001). Glutamina sintetase em tubérculos de batateira em abrolhamento. Dissertação de mestrado em Biologia Celular submetida na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Schirawski, J., Voyatzakis, A., Zaccomer, B., Bernardi, F., Haenni, A.- L. (2000). Identification and functional analysis of the turnip yellow mosaic tymovirus subgenomic promoter. *Journal of Virology.* 74, pp. 11073 - 11080.

Shivprasad, S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K., Dawson, W. O. (1999). Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus based vectors. *Virology.* 255, pp. 312 - 323.

Siegel, R. W., Adkins, S., Kao, C. C. (1997). Sequence-specific recognition of a subgenomic RNA promotor by a viral RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, pp. 11238 - 11243.

Sivakumaran, K., Bao, Y., Roossinck, M. J., Kao, C. (2000). Recognition of the core RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by the replicases of *brome mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus. Journal of Virology.* 74, pp. 10323 - 10331.

Stawicki, S. S., Kao, C. C. (1999). Spatial perturbations within an RNA promoter specifically recognized by a viral RNA-dependent RNA polimerase (RdRp) reveal that RdRp can adjust its promoter binding sites. *Journal of Virology.* 73, pp. 198 - 204.

van Marle, G., Luytjes, W., van der Most, R., van der Straaten, T., Spaan, W. (1995). Regulation of coronavirus mRNA transcription. *Journal of Virology*. 69, pp. 7851 - 7856.

Zeenko, V., Lyubov, A. et al (2002). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with upstream pseudoknot domain in the 3´untranslated region of tobacco mosaic virus RNA. *Journal of Virology*. 76, pp. 5678 - 5691.

http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

CAPÍTULO 2

Expressão da proteína verde fluorescente em *Solanum tuberosum* L. por transformação mediada por *Agobacterium tumefaciens*

ABREVIATURAS

BA – benzilaminopurina

bp – par de bases

CCC – (2-cloroetil)-trimetilamoniaclorido

cDNA – DNA complementar

ER – retículo endoplasmático

g – aceleração devido à gravidade

GFP – proteína verde fluorescente

Gly – glicina

min – minutos

mRNA – RNA mensageiro

NAA – ácido acético naftaleno

nm – nanómetro

ON – "overnight"

ORF – grelha de leitura

Plasmídio Ti – indutor de tumor

PCR – reacção de polimerização em cadeia

RT – temperatura ambiente

RT-PCR – reacção de polimerização em cadeia por transcriptase reversa

sec – segundos

Ser – serina

ss – cadeia simples

T - DNA – DNA de transferência

Tyr – tirosina

UV – ultravioletas

v/v – volume/volume

INTRODUÇÃO

A PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

As moléculas repórter são de extrema utilidade na detecção da expressão génica em plantas transformadas (Haseloff, J. *et al*, 1998). A proteína verde fluorescente (GFP) da medusa bioluminescente *Aequorea victoria* tornou-se uma molécula repórter standard em muitos sistemas biológicos (Davis, S. *et al*, 1998).

A GFP emite luz verde (λ_{max}= 509 nm) após excitação com comprimento de onda ultra-violeta (UV) - máximo a 400 nm - ou luz azul - pico menor a 475 nm (para citações ver Siemering, K. *et al*, 1996). A GFP é uma fotoproteína incaracterística na medida que o seu cromóforo é intrínseco: consiste num tripéptido Ser65-Tyr66-Gly67 da sequência primária da GFP que sofre ciclização e oxidação para formar um cromóforo p - hidroxibenzil- ideneimidazolidinona (para citações ver Siemering, K. *et al*, 1996). A GFP madura assume uma conformação em forma de barril ("barrel-like") que rodeia o cromóforo e actua como um protector solvente. Este processo deve ser autocatalítico ou necessitar apenas de factores celulares ubíquos visto o cDNA da GFP ter sido clonado e ter sido observada fluorescência numa considerável diversidade de organismos tal com Arabidosis, drosófila, células de mamífero, leveduras (para citações ver Siemering, K. *et al*, 1996). Estas propriedades colocam a GFP na família das moléculas repórter pois permite a visualização directa da expressão do gene e a localização subcelular de proteínas em fusão em células vivas. Pode ser observada sem o recurso a técnicas invasivas ou adição de cofactores.

O espectro de fluorescência da GFP é outro aspecto relevante na aplicação desta proteína como molécula repórter. O pico de excitação a 400 nm é útil para a detecção visual directa de organismos ou colónias de células transformadas através de uma lâmpada de UVs. O pico de excitação de 475 nm é importante para aplicações em microscopia de fluorescência ou confocal onde se utiliza conjuntos de filtros optimizados para a detecção de derivados de fluoresceína ou excitação por laser azul (Siemering, K. *et al*, 1996).

A facilidade com que as proteínas fluorescentes podem ser monotorizadas em tecidos vivos permite novas aproximações para melhorar a transformação e regeneração de espécies vegetais com crescimento lento ou difícil (Haseloff, J. *et al*,1998). No entanto, a utilização da GFP em plantas tem sido limitado pelo processamento pós-transcrição aberrante do mRNA correspondente e pela insolubilidade da proteína (Davis, S. *et al*, 1998).

Nos últimos anos tem-se procedido a alterações mutagénicas da GFP com a produção de uma série de variantes úteis, com maior nível de expressão.

A proteína verde fluorescente (GFP) não modificada foi transformada com sucesso em plantas de tabaco através do vírus X da batata e do vírus do mosaico do tabaco (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). Nestas experiências, o gene foi directamente expresso como um mRNA viral nas células infectadas. No entanto, os resultados da expressão da GFP com outros vectores ou outras células ou plantas não foram tão promissores (para citações ver Haseloff, J. *et al*,1998).

A expressão eficiente do cDNA da GFP nas plantas requer que a apoproteína da GFP seja produzida em quantidade suficiente nas células vegetais e que essa apoproteína, não fluorescente, seja modificada, pós-tradução, de forma eficiente, produzindo a GFP madura. Os níveis elevados de GFP observados nas plantas transformadas com vectores virais de RNA demonstram a capacidade das plantas para procederem à maturação, pós-tradução, eficiente da GFP. É a expressão de cópias íntegras do gene da GFP que é problemática. Métodos baseados em reacção de polimerização em cadeia (PCR) provam que enquanto que a amplificação do cDNA da GFP originou produtos completos, o RT-PCR do mRNA da GFP dá origem a produtos truncados (Haseloff, J. *et al*, 1998). Os produtos de RT-PCR mais curtos apresentavam a delecção de uma sequência de 84 nucleótidos com forte similaridade com intrões de plantas. Provavelmente a expressão da GFP é posta em causa por um processamento ("splicing") do mRNA aberrante com a sequência de 84 pb reconhecida como um intrão. Esta explicação justifica também a eficiente expressão da GFP mediada por vectores virais de RNA que se replicam no citoplasma, evitando o processamento (Haseloff, J. *et al*, 1998). As sequências que flanqueiam a delecção demonstra similaridade com intrões vegetais. A sequência de GFP excisada contém uma quantidade elevada de AU, importante no reconhecimento de intrões vegetais (para citações ver Haseloff, J. *et al*). Concluindo, existem fortes indícios para o facto desta região de 84 pb da GFP do *A. victoria* seja reconhecida como intrão quando é transcrita nas plantas, o que resulta numa delecção na grelha de leitura (ORF) da GFP e a produção de uma proteína deficiente.

Haseloff, J. *et al* (1998) mutaram deliberadamente o local de corte a 5' e diminuíram a quantidade de AU no intrão. Todas as modificações afectaram apenas o tipo de codão usado, não alteram nem a sua quantidade nem o aminoácido codificado, logo o produto deste gene alterado, mgfp4, codificava uma proteína em tudo semelhante à GFP do *A. victoria* (Hasseloff, J. *et al*, 1997). Quando a sequência mgfp-4 foi inserida em *Arabidopsis* as células desta apresentaram fluorescência verde. Foi difícil regenerar as plantas com fluorescência mais intensa. A expressão elevada de GFP provoca alguma toxicidade e interfere com a diferenciação, visto ser uma molécula fluorescente que cria radicais livres após excitação, que sofre alterações oxidativas e pode possuir propriedades catalíticas. Em *Arabidopsis* transgénicas, a GFP está presente no citoplasma, embora

também surja no nucleoplasma (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). Está absolutamente ausente de vacúolos, organelos e outros corpos celulares e do nucléolo (Haseloff, J. *et al*, 1998). Nos fotócitos do *A.victoria*, concentrações elevadas de GFP são bem toleradas uma vez que a proteína está sequestrada em grânulos citoplasmáticos (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998).

Davis, S. *et al* (1998) seleccionaram variantes de mgfp4 com substituições aminoacídicas que reduzam o tamanho e/ou aumentem a hidrofilia que produzem proteínas mais correctamente enroladas na forma solúvel. Este aumento da proteína solúvel activa aumenta o sinal fluorescente e diminuí a toxicidade ao reduzir a agregação da GFP.

DIRECCIONAMENTO SUBCELULAR DA GFP

Haseloff, J. *et al* (1998) juntaram vários péptidos de direccionamento subcelular à GFP. Consequentemente direccionaram a proteína para diferentes compartimentos subcelulares. A título de exemplo, quando se acrescentou à GFP uma sequência de direccionamento mitocondrial, proveniente da proteína oxidase C IV do citocromo da levedura, a localização da GFP ficou restrita à mitocôndria tanto em leveduras como em *Arabidopsis* (Haseloff, J. *et al*, 1998). Adicionalmente, os mesmos autores acrescentaram uma sequência sinal de carboxipeptidase Y de levedura e de uma quitinase básica de *Arabidopsis,* conseguindo direccionar com sucesso a GFP para a via secretora.

Uma variante que apresenta um melhoramento substancial relativamente à GFP não modificada é a direccionada para o retículo endoplasmático (ER), mgfp-4-ER. Contém um péptido sinal N-terminal derivado de uma quitinase básica vacuolar N-terminal de *Arabidopsis* e uma sequência HDEL C-terminal que garantem a entrada na via secretora e a retenção da proteína no lúmen do ER. Esta GFP modificada tornou possível regenerar de forma consistente plântulas férteis com fluorescência intensa (Haseloff, J. *et al*, 1998). Através de microscopia confocal verificou-se que a mgfp-ER se encontra sobretudo no sistema endomembranar. Está excluída do núcleo, embora não de leucoplastos ou proplastídeos no citoplasma. A acumulação da mgfp-ER nestes corpos celulares, para além do ER, pode indicar um reconhecimento errado do péptido sinal N-terminal. Estas sequências sinal podem actuar como sequências de trânsito para a entrada nos plastídeos. Alternativamente, pode existir troca directa entre os plastídeos em desenvolvimento e o sistema endomembranar. Não foi detectada fluorescência no citoplasma, logo a proteína deve ser entregue de forma eficiente ao ER ou aos plastídeos. A acumulação da GFP nos proplastídeos em plantas transformadas com mgfp-4 não se verifica (Haseloff, J. *et al*, 1998).

Não é claro se os efeitos benéficos de direccionar a GFP para o ER são devidos a um aumento da concentração ou a uma acumulação mais segura da GFP madura dentro

das células. Se a acumulação de proteínas fluorescentes leva á formação de radicais livres em células iluminadas, é concebível que remover a GFP do núcleo pode proteger as células da danificação do DNA causadas por espécies altamente reactivas. No entanto, é também possível que a fusão com a sequência sinal possa melhorar as propriedades da GFP ou que a localização da GFP no lúmen do ER possa melhorar a sua maturação e acumulação. A maturação da apoproteína da GFP é sensível à temperatura com a apoproteína a enrolar-se de forma errada em certas condições fisiológicas. O lúmen do ER contém componentes que auxiliam o enrolamento das proteínas (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998).

MELHORAMENTO DA MATURAÇÃO DA GFP

A expressão da GFP em vários sistemas heterólogos foi descrita como pobre e inconstante (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). Em experiências em que sujeitaram *E. coli* transformadas a várias temperaturas (Haseloff, J. *et a,* 1998) reparou-se que a proporção de GFP que é fluorescente decresce de forma invariável com o aumento da temperatura de incubação das bactérias, o que indica que ou a GFP madura ou a sua via de maturação é sensível à temperatura. A GFP madura mostrou ser altamente estável com uma fluorescência não afectada por temperaturas tão altas como 65º C *in vitro* ou 42º C em bactérias (Cubitt, A. *et al*, 1995). Assim, as temperaturas mais altas de incubação devem interferir com a maturação pós-tradução da GFP. Esta termosensibilidade parece ser suprimida em mutantes de GFP, GFP-A, em que ocorre a substituição de dois aminoácidos em relação à mgfp-4.

A maturação pós-tradução da GFP compreende presumivelmente o enrolamento inicial da apoproteína na conformação activa o que permite as reacções de ciclização e oxidação e consequente formação do cromóforo (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). A proteína madura deve depois ser correctamente enrolada para manter a sua fluorescência e para proteger o cromóforo (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). Em princípio, qualquer destes processos pode ser sensível à temperatura e portanto responsável pela termosensibilidade da GFP durante a sua maturação. No entanto, medição dos níveis de oxidação, após tratamento anaeróbio, da GFP a 25º C e 37º C revelaram que a oxidação da GFP era significativamente mais rápida a 37º C que em bactérias em situação normal. Logo, não é este o passo limitante na maturação da GFP (para citações ver Haseloff, J. *et al*, 1998). Em contraste, o enrolamento da GFP na conformação activa é claramente sensível à temperatura e as substituições de aminoácidos presentes nos mutantes GFP-A permitem o enrolamento apropriado a temperaturas mais elevadas.

As substituições de aminoácido no mutante GFP-A podem aumentar a estabilidade termodinâmica da apoproteína. Em alternativa, podem assegurar que a via de enrolamento correcta predomina reduzindo a tendência das protoproteínas intermediários se agregarem ou diminuindo a formação de intermediários que não pertençam à via de enrolamento ortodoxa. Também é possível que as substituições aminoacídicas do GFP-A actuem indirectamente na via de enrolamento a altas temperaturas, ou aumentando o grau de ciclização do cromóforo o que reduz os níveis de espécies de GFP imaturas, ou aumentando a afinidade de apoproteínas parcialmente enroladas por uma chaperonina celular. Análises biofísicas indicam que a GFP-A deve ser termodinamicamente mais estável que a apoproteína nativa. As substituições presentes nos mutantes termotolerantes provocam uma maior acumulação de GFP-A em células bacterianas do que de GFP não modificada, assim como, melhoram o enrolamento da proteína. Isto deve reflectir alguma susceptibilidade de apo-GFP não correctamente enrolada a ser degradada pela maquinaria proteolítica das células (Siemering, K., *et al,* 1996).

MODIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA GFP

O espectro de fluorescência da GFP exibe picos de excitação a comprimento de onda de 395 nm e 475 nm, mas predominantemente a 395 nm. Esta é uma propriedade útil para a detecção simples da proteína usando uma lâmpada de ultra violetas (UV) (Haseloff, J. *et al,* 1998). Os UVs excitam a GFP sem obscurecerem a emissão verde permitindo uma observação simples de material transformado. No entanto, a excitação por luz azul (à volta dos 470nm) é essencial para obter imagens em microscopia confocal (Haseloff, J. *et al*, 1998).

A amplitude dos picos de excitação da GFP pode ser alterada por mutagénese. As mutações produzem essencialmente novos espectros de excitação e emissão. Este tipo de mutações ocorre principalmente na região do cromóforo (Cubitt, A. *et al*, 1995) ou na zona C-terminal da GFP-A (Siemering, K., *et al,* 1996). Estas mutações parecem afectar o microambiente do cromóforo tal como influenciar o equilíbrio entre os dois estados espectroscópicos deste (para citações ver Haseloff, J. *et al,* 1998). Uma destas mutações, I167T, mostrou aumentar a amplitude do pico de excitação de 475 nm relativamente ao pico de 395 nm. A combinação desta mutação com aquelas presentes na GFP-A produz uma variante, GFP-5, com dois picos de excitação, de 395 nm e 473 nm de amplitude quase igual e um espectro de emissão (λ_{max}= 507 nm) semelhante ao do tipo selvagem. A GFP-5 retém o fenótipo termotolerante mas as células transformadas com esta variante fluorescem de 39 a 111 vezes mais intensamente que as que expressam GFP nativa (Haseloff, J. *et al,* 1998). O espectro de excitação alargado da GFP-5 permite a excitação eficiente da proteína tanto por UVs como por luz azul. Por exemplo, a expressão de genes

de proteínas de fusão com a GFP-5 pode ser rapidamente detectada após a transformação dos tecidos vegetais através de uma lâmpada de UVs. O mesmo material pode ser utilizado em microscopia confocal. A utilização de um mutante com excitação por dois comprimentos de onda permite que sinais indistintos ou fracos possam ser distinguidos da autofluorescência natural das plantas alterando a fonte de excitação. Por exemplo, os cloroplastos são intensamente autofluorescentes mas são pouco excitados por luz UV. Por rotina utiliza-se a excitação por UV para a detecção tanto visual como microscópica de tecidos transformados (Haseloff, J. *et al,* 1998). É possível que estas mutações afectem etapas do enrolamento ou maturação da proteína.

VISUALIZAÇÃO (*IMAGING*) DA GFP EM CÉLULAS VEGETAIS

A GFP pode ser aplicada em três áreas distintas, (1) visualização dinâmica de proteínas marcadas dentro das células, (2) marcação selectiva e monotorização de células em tecidos vegetais em crescimento, (3) identificação individual de plantas transgénicas que expressam a GFP. Por exemplo, diferentes motivos peptídicos podem formar uma proteína de fusão com a GFP permitindo a visualização de uma estrutura em particular dentro da célula e/ou observar a distribuição subcelular da proteína de fusão. Pode-se acrescentar que a GFP como gene repórter permite a detecção por simples observação de células ou plantas transgénicas durante a regeneração das plantas (Haseloff, J. *et al*).

Tecidos vegetais intactos são difíceis de manipular em microscopia pois consistem em camadas espessas de paredes celulares altamente refractáveis, citoplasmas aquosos e componentes auto-fluorescentes ou difusores ("scattering") de luz. Existem duas formas de contornar estas limitações, (1) fixar e clarear o tecido com um meio de montagem com um index refractário alto, (2) visualizar directamente os tecidos vivos utilizando microscópios ópticos adaptados (Haseloff, J. *et al*, 1998). A fixação e clareamento dos tecidos vegetais cria muitas vezes artefactos ou perda de fluorescência da GFP e sem dúvida trabalhar com tecidos vivos é vantajoso. A auto-fluorescência natural e a espessura dos tecidos vegetais intactos significa que a dificuldade de focagem impede as ampliações maiores obtidas com um microscópio epifluorescente convencional. No entanto, a microscopia confocal pode ser utilizada para observar tecidos que expressem GFP. A visualização confocal permite sinalizar fluorescência num estreito plano de focagem, sem interferência de manchas de outros planos não focados. Em seguida procede-se à reconstrução de estruturas tridimensionais seriando os vários planos de focagem ópticos (Haseloff, J. *et al*, 1998).

A expressão da GFP no interior de organismos produz uma fluorescência intrínseca marcando processos celulares normais. Técnicas ópticas de alta resolução podem ser utilizadas como uma forma não invasiva para monotorizar as actividades dinâmicas das

células vivas. Em estudos que compreendam séries de imagem intervaladas por lapsos de tempo é importante que a fluorescência da GFP seja intensa para minimizar os níveis de iluminação que possam causar fototoxicidade e "photobleaching" durante a observação. O recurso a estas observações fornece uma melhor compreensão dos movimentos relativos dos componentes celulares (Haseloff, J. *et al*, 1998).

Por outro lado, a expressão da GFP pode ser circunscrita a tipos celulares específicos dentro da planta. Fornece um meio para visualizar o comportamento de células individuais no interior de um organismo vivo. Por exemplo, Haseloff, J. *et al* (1998) inseriram, ao acaso, um gene para um activador de transcrição de levedura, GAL4, acoplado ao gene de mgfp-ER no genoma de *Arabidopsis.* Criaram uma biblioteca de várias linhagens de *Arabidopsis* que expressam o GAL4 num padrão particular, dependendo das sequências genómicas adjacentes. Esse padrão pode ser imediata e directamente visível devido à presença de GFP. A expressão do GAL4 nestas linhagens permite detectar de forma precisa a expressão ectópica de genes. Um gene alvo pode ser clonado sob o controlo de um promotor activado pelo GAL4 e separadamente transformado em *Arabidopsis.* É mantido em silenciamento na ausência de GAL4. O cruzamento genético desta linhagem com qualquer uma da biblioteca descrita acima permite a activação específica do gene alvo em determinados tecidos ou tipos celulares e as consequências fenotípicas da falta de expressão, incluindo as letais para o organismo podem ser estudadas.

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM BATATEIRA

A espécie *Arabidopsis* é hoje em dia o modelo biológico por excelência usado para o estudo dos processos fisiológicos básicos das plantas. No entanto, um número substancial de aspectos do desenvolvimento vegetal só podem ser estudados em sistemas específicos. Por exemplo, o ciclo de vida do tubérculo apenas pode ser estudado em plantas como a batateira (*Solanum tuberosum* L.).

A batateira é uma das mais importantes culturas mundiais, sendo a quarta mais produzida anualmente. Em países pouco desenvolvidos representa um dos alimentos base da dieta, sendo produzida por muitos agricultores de subsistência. As principais razões para a importância da batata em países do terceiro mundo são o seu elevado valor nutricional, a simplicidade da sua propagação por multiplicação vegetativa (Fernie e Willmitzer, 2001) e alta produtividade (Beaujean *et al*, 1998).

A batateira é tetraploide apresentando um alto grau de heterozigotia o que reduz a eficiência dos métodos tradicionais de cruzamento. Uma estratégia alternativa para o melhoramento das variedades de batateira compreende as técnicas *in vitro* como por exemplo a hibridização somática e a mutagénese. Sendo membro da família das

SOLANACEAE, esta cultura foi das primeiras a ser utilizadas em biotecnologia (Beaujean *et al*, 1998).

Estrutura e Desenvolvimento da Batateira

A batateira é uma planta herbácea com uma filotaxia espiral. As folhas são imparapínuladas com pequenos folíolos adicionais entre as pínulas. O caule aéreo é inicialmente erecto mas mais tarde torna-se parcialmente procumbente. É uma planta anual que se perpetua geralmente através de tubérculos subterrâneos (Harris, 1992).

A germinação da batateira é epigenea, isto é, os cotilédones surgem acima do solo devido ao alongamento do hipocótilo. A radícula emerge da extremidade micropilar da semente e mais tarde desenvolve raízes laterais. As primeiras folhas são ovaladas e pubescentes. Quando a plântula tem apenas alguns centímetros desenvolvem-se brolhos no gomo cotiledonar que depois de penetrarem no solo formam pequenos tubérculos (Harris, 1992).

Uma característica interessante da morfogénese do caule folhoso é que os gomos axilares têm diversas potencialidades de desenvolvimento. Dependendo normalmente da sua posição no caule, estes gomos podem desenvolver caules com folhas – gomos aéreos – ou brolhos com inter-nós alongados, extremidade dobrada em forma de ança e apresentando pequenas brácteas em espiral – os gomos basais subterrâneos. No entanto, qualquer gomo axilar pode desenvolver caule ou brolho em condições apropriadas (Harris, 1992).

Os tubérculos desenvolvem-se a partir da região sub-apical dos brolhos. A formação de tubérculos deve-se à conjugação de dois processos independentes: A formação do brolho e a tuberização da extremidade do brolho, controlados por factores distintos. O número de gomos axilares que desenvolvem brolhos, assim como o comprimento destes, são afectados de forma adversa por baixos níveis de nutrientes. Os factores ambientais também podem ser importantes. A humidade e a obscuridade favorecem o desenvolvimento de brolhos, embora apenas na presença de um ápice dominante. Auxinas e giberelinas, aplicadas em conjunto, promovem o desenvolvimento de um brolho a partir de um gomo aéreo isolado. Passados 10-15 dias, ocorre normalmente a reconversão num caule folhoso. A aplicação de giberelinas em caules de plantas intactas levam ao desenvolvimento de brolhos na região apical (para citações ver Harris, 1992).

Na planta adulta, são os brolhos formados mais tarde, na parte inferior, que formam os primeiros tubérculos, sendo estes os que atingem maiores dimensões. O tubérculo de batateira é um caule modificado com eixos menores e mais alargados e folhas pouco desenvolvidas. Os "olhos" da batata são constituídos por uma bráctea que

cobre normalmente três rebentos com inter-nós não desenvolvidos: o gomo axilar original da bráctea e os dois gomos de segunda ordem dos seus primeiros primórdios foliares (para citações ver Harris, 1992). O primeiro sinal externo do aparecimento do tubérculo é o alargamento radial da região sub-apical do brolho. Quando as condições para o início da tuberização estão reunidas, o alongamento do brolho pára e as células da medula e do cortéx (região sub-apical) alargam, dividindo-se depois longitudinalmente. Quando a porção alargada atinge 2 a 4 mm, as divisões longitudinais páram, iniciando-se divisões sem orientação definida e alargamento celular até o tubérculo atingir a sua massa final (Fernie e Willmitzer, 2001). O crescimento do tubérculo depende concomitantemente da expansão dos inter-nós apicais (para citações ver Harris, 1992).

A formação dos tubérculos ocorre mais cedo a baixas temperaturas e é retardada por temperaturas elevadas (para citações ver Harris, 1992). Os efeitos das temperaturas elevadas podem ser invertidos por (2-cloroetil)-trimetilamoniaclorido (CCC). As giberelinas reduzem a tuberização a todas as temperaturas. É possível que o efeito das temperaturas elevadas se exerça através da produção de uma substância de crescimento, possivelmente giberelinas.

A tuberização da batateira é um processo do desenvolvimento complexo. Alterações morfológicas e fisiológicas durante a tuberização são influenciadas de forma intensa por factores ambientais como o fotoperíodo, a temperatura e a intensidade luminosa. A batateira *in vivo* é capaz de percepcionar as alterações das condições ambientais requeridas ao despoletar da produção de tubérculos. As folhas têm um papel importante na percepção dos estímulos ambientais e na síntese de reguladores de crescimento endógenos e de substâncias indutoras de tubérculos. O início de dias curtos desencadeia alterações no equilíbrio dos reguladores de crescimento endógeno e estimula o transporte das substâncias indutoras de tubérculos das folhas para outras partes da planta (para citações ver Dobránszki, J. E Mándi, M., 1993).

Plantas *in vitro* respondem a fotoperíodos curtos pela rápida formação de microtubérculos. A exposição a obscuridade contínua estimula de igual modo a rápida formação de microtubérculos (Dobránszki, J. E Mándi, M., 1993)

A Transformação de *Solanum tuberosum* L. por *Agrobacterium tumefaciens*

O conceito central da tecnologia da transformação genética implica a capacidade de incorporar sequências nucleotídicas nos genomas celulares. Plantas transgénicas são utilizadas para originar mutantes na pesquisa fundamental e para auxiliar em estudos de fenómenos biológicos complexos como patogenicidade, organização do genoma, transdução de sinais. Três métodos são responsáveis por praticamente todas as

transgénicas produzidas até agora: a transformação indirecta mediada por *Agrobacterium* ou os sistemas directos de electroporação ou biolística (Alves *et al, 1999)*. Acrescentem-se ainda os vectores virias. Um processo de transformação estável implica a inserção de uma sequência de DNA estranha no genoma vegetal e a regeneração das células em que tal acontece (Alves, A. *et al*, 1999).

Agrobacterium tumefaciens é o agente patogénico causador do "crown gall" caracterizado por um tumor em zonas feridas da planta. O crescimento do tumor resulta da expressão na planta de genes codificados por uma sequência de DNA de origem agrobacteriana que foram transferidos e integrados de forma estável no genoma vegetal. É esta capacidade que torna as *Agrobacterium* tão importantes em biotecnologia.

O segmento de DNA transferido de *Agrobacterium* para as plantas é uma cópia de uma sequência denominada T-DNA (DNA de transferência) que está localizada num plasmídio específico, o plasmídio Ti (indutor de tumor). O T-DNA é delimitado por sequências repetitivas de 25 bp. Estes bordos são os únicos elementos necessários para direccionar o processamento do T-DNA. Qualquer DNA entre estes dois bordos é transferido para a célula vegetal. No entanto, o T-DNA não codifica os produtos que medeiam a sua transferência. O T-DNA selvagem codifica enzimas para a síntese dos reguladores de crescimento auxina e citocinina e produção de outros compostos cujo efeito é o fenótipo: tumor. O T-DNA selvagem também codifica opinas, enzimas que sintetizam derivados de aminoácidos que apenas as *Agrobacterium* utilizam como fonte de carbono e azoto. As *Agrobacterium* manipulam geneticamente as plantas de modo a que estas as sustentem (para citações ver Zupan, J. *et al,* 1995). Os humanos manipulam as *Agrobacterium* de modo a que as plantas adquiram características de interesse.

O processamento e transferência do T-DNA são mediados por produtos codificados pela região *vir* também localizado no plasmídio Ti. Os genes *vir* são estritamente regulados. A sua expressão ocorre apenas na presença de células vegetais feridas, os alvos da infecção. O control da expressão destes genes é mediada por proteínas VirA e VirG. A Vir A detecta os pequenos compostos fenólicos libertados pelas plantas feridas e autofosforila. A fosforilação da Vir G pela Vir A leva à activação da transcrição dos genes *vir* (para citações ver Zupan, J. *et al,* 1995).

Depois da indução dos genes *vir* inicia-se a produção da molécula a ser transferida, cadeia - T, uma cópia de cadeia simples (ss) do T - DNA. As proteínas Vir D1 e Vir D2 formam um complexo que reconhece os bordos de 25 pb do T - DNA e produzem uma quebra ss endonucleotídica na cadeia inferior de cada bordo. Estas quebras são percepcionadas como os locais de iniciação e terminação da cadeia - T. Depois do corte a Vir D2 mantém-se associada à extremidade 5' da cadeia - T. Esta polaridade pode assegurar que a extremidade 5' é a extremidade "leading" (Zupan, J. *et al,* 1995).

A cadeia-T tem de atravessar inúmeras membranas e espaços celulares antes de chegar ao núcleo da planta. Para preservar a sua integridade forma um complexo com proteínas vir E2. Estas proteínas não exigem especificidade da sequência nucleotídica e cobrem por completo a cadeia - T ss, protegendo-a da degradação por nucleases. Por outro lado, as Vir E2 linearizam o DNA ss o que facilita a sua transferência através dos canais membranares. O complexo - T sai da bactéria passando através das membranas interna e externa e da parede celular. As proteínas Vir B devem estar envolvidas na transferência do complexo - T ao formarem um aparato associado às membranas bacterianas responsável pela sua exportação. Atravessa, em seguida, a parede celular e membrana da célula da planta. Dentro da célula vegetal o complexo - T direcciona-se para o núcleo atravessando a sua membrana e integrando-se no genoma. As proteínas Vir E2 e Vir D2 do complexo - T devem ser as responsáveis pela passagem da cadeia - T pelos poros nucleares. A Vir D2 associada à extremidade 5' da cadeia - T liga-se a um "nick" existente no DNA da planta. A dupla cadeia do DNA da planta separa-se nesta região e a extremidade 3' do complexo - T emparelha numa zona perto. Enzimas de reparação e recombinação da planta ligam covalentemente a extremidade 3' ao DNA vegetal. Estas reacções resultam na introdução da cadeia - T numa das cadeias do genoma. A tensão criada irá criar um "nick" na outra cadeia do genoma. A maquinaria de reparação de falhas e de síntese de DNA usa a cadeia - T como molde para formar uma cadeia dupla (Zupan, J. *et al,* 1995).

A transformação com *Agrobacterium* caracteriza-se pela cocultivação de explantes de vários tecidos ou órgãos (ex. folha, segmento de caule com um gomo, discos de tubérculo) com *Agrobacterium* manipuladas de modo a conterem marcadores de selecção e genes reporter no vector plasmidial (Wenzler, H. *et al*, 1989). Visto a transformação ser um fenómeno raro, os marcadores de selecção dificultam o desenvolvimento de grande número de células não transformadas. No entanto, o uso do agente selectivo, muitas vezes um antibiótico ou herbicida, retarda a diferenciação celular e desenvolvimento das plântulas (Alves, A. *et al*, 1999). Existem também reservas quanto à sua possível libertação e consequente contaminação ambiental (Wenzler, H. *et al*, 1989).

A transferência de DNA estranho para as células vegetais é muitas vezes levada a cabo usando vectores plasmidiais que derivam do plasmídio Ti de *Agrobacterium tumefaciens.* A remoção de todos os genes no interior do T - DNA não impede a sua transferência para as plantas mas previne a formação do tumor. Plasmídios Ti e as estirpes de *Agrobacterium* sem capacidade oncogénica designam-se "disarmed" (Hellens, R. *et al*, 2000).

Os dois principais componentes numa transferência de genes mediada por *Agrobacterium* eficiente são o T-DNA e a região *vir* que podem estar localizadas em plasmídios separados. Esta é a base do sistema binário de vectores Ti. Os genes *vir* são fornecidos por um plasmídio Ti "disarmed" característico de cada estirpe. O T-DNA, onde

estão localizados os genes a ser transferidos, localiza-se noutro plasmídio que pela sua função se denomina vector. O vector binário Ti replica-se tanto em *Escherichia coli*, onde é mais fácil realizar as técnicas *in vitro* de manipulação de genes, como em *Agrobacterium* (Hellens, R. *et al*, 2000).

As estirpes de *Agrobacterium* possuem marcadores de selecção de resistência a antibióticos que se localizam ou no cromossoma ou no plasmídio Ti "disarmed" que permitem eliminar *Agrobacterium* em piores condições. Para impedir totalmente o crescimento das *Agrobacterium* após cocultivação com os explantes de planta utilizam-se antibióticos derivados da penicilina (Hellens, R. *et al*, 2000).

Muitos vectores binários Ti possuem um local de origem de replicação com um leque de hospedeiros alargado o que permite a sua actividade em várias bactérias Gram-negativas incluindo a *E. coli* e *Agrobacterium*. Em alternativa podem existir dois locais de origem de replicação próprios para cada uma das espécies bacterianas. O baixo número de cópias produzido pelo local de origem de replicação em *E. coli* pode ser um problema. A incorporação do local de origem de replicação *ColE1* do plasmídio pBR322 alivia este problema. Por outro lado, tem-se verificado uma redução progressiva dos vectores binários Ti. As zonas responsáveis pela replicação do vector são reduzidas ao local de origem de replicação sendo transferidas para o genoma da agrobactéria (Hellens, R. *et al*, 2000).

Alterações significativas da virulência da *Agrobacterium* aumentaram o número de espécies vegetais susceptíveis de serem transformadas pelo T - DNA, um grupo importante foram os cereais, ao melhorarem a frequência da transferência do T - DNA. A principal modificação foi melhorar a activação dos produtos Vir G que activam a transcrição do restante família *vir*. Outra modificação diz respeito ao aumento da expressão do gene *virE1* que codifica as proteínas que se associam à cadeia - T ss (Hellens, R. *et al*, 2000).

O vector binário Ti utilizado neste trabalho pertence ao grupo dos plasmídios pCAMBIA. Estes vectores possuem largo conjunto de hospedeiros devido à presença da origem de replicação do plasmídio pVS1 de *Pseudomonas* que é extremamente estável na ausência de selecção. Acrescente-se ainda a origem de replicação do pBR322 que permite um alto rendimento nas preparações de plasmídio em *E. coli* (Roberts, C. *et al*, 1998).

A utilização dos locais de restrição múltipla do pUC 8 e 9 simplificam a escolha da enzima a usar na clonagem. Na era do PCR é mais importante dispor de alguns bons locais de restrição do que de uma grande quantidade deles. Estes locais de restrição múltipla não contêm locais de iniciação ou terminação. A localização do local de restrição múltipla dentro de um fragmento *LacZ*α permite a selecção por azul/branca as colónias de *E. coli* (Roberts, C. *et al*, 1998).

O gene de selecção na planta está associado ao promotor e terminador CAMV35S. No caso do pCAMBIA 1302 esta função é desempenhada pelo gene *hptII* que confere resistência à higromicina. Este gene foi sujeito a "site-directed mutagenesis" para eliminar locais de restrição inapropriados por mutações silenciosas (Roberts, C. *et al*, 1998).

O marcador de resistência bacteriano é o *nptII* que confere resistência à kanamicina, ao codificar uma fosfotransferase neomycin que fosforila o grupo 3'OH da kanamicina retirando-lhe a capacidade de se ligar ao seu alvo, os ribossomas. A capacidade para regenerar as plantas transgénicas é afectada pelo tipo de antibiótico de selecção e o sistema de cultura utilizada. A higromicina B, um antibiótico produzido por *Streptomyces hygroscopicus*, é um antibiótico eficiente para eliminar bactérias, fungos e células eucarióticas ao inibir a síntese proteica. A identificação do gene da fosfotransferase que inactiva a higromicina B permite a sua utilização como antibiótico de selecção para obter células transformadas que contenham o gene de resistência (para citações ver Lin, J.-J. *et al*, 1996). A espectinomicina afecta a função das subunidades ribossomais 30 S e 50 S inibindo de forma reversível a síntese proteica em bactérias. A augmentina pertence ao grande grupo das penicilinas. A parede celular de peptidoglicanos envolve a membrana celular de modo contínuo impedindo a sua ruptura por choque osmótico. A inibição da síntese da parede celular origina falhas por onde a membrana celular contacta com o meio exterior hipotónico sofrendo rupturas. As penicilinas têm este papel inibitório, particularmente associam-se e inactivam as transpeptidases que originam o esqueleto peptidoglicano da parede celular.

A estrutura modular das cassetes reporter do pCAMBIA compreende para lá do gene reporter uma zona de iniciação - Kozak consensus - e uma zona de terminação - inclui uma sequência de seis tripletos de histidina - da tradução. As sequências consensuais para o início da tradução, tanto em procarióticos como em eucarióticos, permite a ligação forte dos ribossomas e a tradução eficiente do gene reporter ou de outros genes incorporados nesta estrutura modular. Um codão de finalização a montante da região de iniciação assegura que não ocorra fusão devido a tradução por readthrough. A escolha do local de restrição a 5' *Nco I* que possui o codão ATG no local de corte, garante que a sequência a inserir entra de modo a ser traduzida correctamente. A existência de um local *Spe I* a 5' e de um local *Nhe I* a 3' do gene reporter com extremidades coesivas compatíveis permite o rearranjo ou reorientação de genes. Estes locais mantêm a grelha de leitura correcta. Se uma sequência codificante for clonada no local Nhe I a proteína vai possuir uma sequência alvo carboxy-terminal constituída por seis histidinas - hexa-histidine tag. Se se pretender a expressão de uma proteína sem hexa-histidine tag tem que se fazer a clonagem no local *BstEII*. Neste caso é necessário incluir um codão de finalização (Roberts, C. *et al*, 1998).

O pCAMBIA 1302 tem como gene reporter a versão da GFP mgfp5 (Roberts, C. *et al*, 1998). Esta variante produz dois picos de excitação, de 395 nm e 473 nm de

amplitude quase igual e um espectro de emissão (λ_{max}= 507 nm) semelhante ao do tipo selvagem. A mgfp5 retém o fenótipo termotolerantes mas as células transformadas com esta variante fluorescem de 39 a 111 vezes mais intensamente que as que expressam GFP (Haseloff, J. *et al*). O espectro de excitação alargado da mgfp5 permite a excitação eficiente da proteína tanto por UVs como por luz azul. Por exemplo, a expressão do gene de proteínas de expressão com a mgfp5 pode ser rapidamente detectada após a transformação dos tecidos vegetais através de uma lâmpada de UVs. O mesmo material pode ser utilizado em microscopia confocal.

Culturas *In Vitro*

Uma etapa crítica para o estabelecimento de plantas transgénicas é a regeneração de plântula após a introdução do DNA recombinante. Tradicionalmente, a regeneração dos tecidos vegetais processa-se em meio de cultura solidificado com agar.

À regeneração de plântulas através de cultura de tecidos num ambiente estéril e artificial aplica-se o termo *in vitro*. A regeneração de plântulas pode ser conseguida por um de três métodos: cultura de embriões, embriogénese somática e organogénese. A cultura de embriões consiste na cultura asséptica de um embrião zigótico num meio nutritivo que simule o ambiente do endosperma (Tisserat, B., 1987).

A embriogénese somática corresponde à produção de estruturas tipo embrião por células somáticas. O embrião somático é uma estrutura bipolar independente, não estando fisicamente ligada ao tecido de origem. Estes embriões podem desenvolver ou germinar em plântulas. Ao contrário do que acontece *in vivo* onde este acontecimento é intra-ovular *in vitro* pode ocorrer em vários tecidos vegetais. A produção de embriões somáticos pode ocorrer de forma directa ou indirecta. A forma directa envolve a formação de um embrião assexual de uma única célula ou de um grupo de células do tecido explante sem a intervenção de tecido caloso. A forma indirecta consiste na proliferação de tecido caloso a partir do explante e subsequente iniciação de pró-embriões, geralmente em meios com auxinas. A transferência do tecido caloso para meio nutritivo sem auxinas induz a formação de embriões bipolares a partir das iniciais pró-embrionárias. Quando as condições o permitem estes embriões germinam e produzem plântulas. Normalmente, apenas uma pequena percentagem de células do explante contribui para a formação de tecido caloso. Estas células localizam-se nas camadas superficiais ou estão em contacto físico com o meio de cultura (Tisserat, B., 1987).

O desenvolvimento de plântulas através de organogénese consiste na formação e crescimento de caules a partir de tecido caloso ou a iniciação e crescimento de gomos

axilares e posterior enraizamento. O caule é uma estrutura unipolar e está fisicamente ligado ao tecido de origem (Tisserat, 1987).

A cultura *in vitro* de meristemas de batateira, combinada por vezes com tratamentos térmicos ou químicos anti-virais são o único método eficiente para eliminar infecções virais de cultivares sistemicamente infectados sem induzir alterações genéticas (para citações ver Li, P., 1985). Culturas *in vitro* do ápice caulinar ou de segmentos com um gomo axilar não infectados por vírus são uma forma rápida de multiplicar plântulas sem perigo de reinfecção. As plântulas regeneradas de culturas de tecido caloso, meristemas, ápice caulinar e segmentos nodais mantêm a estabilidade genética (Li, P., 1985).

A micropropagação através de gomos axilares é um método eficiente de multiplicar rapidamente batateiras que podem ser armazenadas por longos períodos entre sub-culturas. Outros explantes utilizados para regenerar plântulas são extremidades caulinares, meristemas, segmentos de folha, caule ou tubérculo (Harris, 1992).

A regeneração de plântulas a partir de folhas compreende uma primeira fase de formação de tecido caloso que requer auxinas e citocininas; as auxinas devem ser retiradas para permitir a formação das plântulas (para citações ver Harris, 1992).

Gomos isolados de rebentos estiolados de batata podem desenvolver brolhos ou raízes em cultura asséptica. Sistemas *in vitro* para formação de microtubérculos consistem em explantes de caule ou brolho com um único gomo axilar desenvolvendo este um tubérculo em vez de caule folhoso quando colocado, em obscuridade, num meio indutor de tuberização. Este meio caracteriza-se por um elevado conteúdo em sacarose suplementado com citocininas e facultativamente com CCC, um composto antagónico às giberelinas (Fernie A. *et al*, 2001).

A estrutura dos pequenos tubérculos induzidos *in vitro* é basicamente igual ao dos crescidos no campo. No entanto, sub-culturas repetidas em obscuridade pode ocorrer a deplecção de substâncias endógenas de crescimento (para citações ver Harris, 1992). Pela sua natureza os microtubérculos praticamente não apresentam resposta ao fotoperíodo, o factor que mais influencia a tuberização (Fernie A. *et al*, 2001).

As giberelinas dificultam a tuberização de segmentos de caules estiolados com um gomo axilar favorecendo o desenvolvimento de brolhos. As auxinas e o ácido abcíssico também têm um efeito adverso sobre a tuberização. Pelo contrário este fenómeno exige níveis altos de sacarose, 6 a 8%. Por outro lado, os inibidores das sínteses de proteínas e ácidos nucleicos reduzem ou atrasam a tuberização mas não a evitam (para citações ver Harris, 1992). A aplicação exógena de citocininas aumenta a velocidade de indução da tuberização em brolhos (Fernie A. *et al*, 2001). Recentemente foi observado que o ácido jasmónico e seus derivados possuem a propriedade de indução de tubérculos (Fernie A. *et al*, 2001). É importante que os explantes sejam constituídos por apenas um gomo axilar de modo a aliviar a inibição da tuberização pelo ápice caulinar (Levy, D. *et al*, 1993).

Do ponto de vista da manutenção da qualidade e armazenamento a dormência das batatas é muito importante. Entendem-se como dormentes os gomos do tubérculo que no período de dormência não crescem em nenhuma situação mas que retêm o potencial de o fazer (para citações ver Harris, 1992). O período de dormência não pode ser separado da iniciação da tuberização e alargamento do tubérculo (Fernie A. *et al*, 2001). A tuberização inicia-se se o meristema apical se tornar dormente quando as divisões longitudinais na zona sub-apical do brolho param e são substituídas por divisões entre o quarto e oitavo nó. Os gomos nos "olhos" da batata tornam-se dormentes sucessivamente, sendo o "olho" apical o último (para citações ver Fernie A. *et al*, 2001).

A conservação *in vitro* de microtubérculos é uma técnica pouco onerosa que facilita a disponibilidade de material vegetal em qualquer altura e evita a transferência de doenças (para citações ver Golmirzaie *et al*, 1997-98). Plântulas *in vitro* crescem num meio de cultura que contenha sais minerais, uma fonte de carbono, vitaminas e uma baixa concentração de auxinas ou giberelinas. As plantas consomem os nutrientes deste meio em dois, três meses o que implica que têm de ser frequentemente transferidas para meio fresco. A adição de osmóticos ou retardadores de crescimento ao meio mostrou-se eficiente na redução do crescimento de diferentes espécies vegetais. Osmóticos como o manitol ou sorbitol reduzem a absorção mineral pelas células ao alterarem a pressão osmótica, retardando o crescimento vegetal. O sorbitol não produz qualquer alteração fisiológica como formação de tecido caloso ou vitrificação. Estas reacções indesejáveis são produzidas pelo manitol (para citações ver Golmirzaie *et al*, 1997-98). Os retardadores de crescimento podem produzir alterações fisiológicas ou mutações que ameaçam a estabilidade genética do material conservada. Reduzir a temperatura de crescimento vários graus centígrados também minimiza a taxa de crescimento. As plantas *in vitro* crescem em tubos de cultura fechados estando sujeitas a baixas concentrações de dióxido de carbono; a absorção de carbono é mantida ao suplementar o meio com açúcar. Reduzir a intensidade luminosa afecta a taxa de crescimento ao reduzir os requerimentos fotossintéticos e consequentemente o metabolismo (para citações ver Golmirzaie *et al*, 1997-98).

MATERIAL E MÉTODOS

INDUÇÃO DE PLANTAS A PARTIR DE TUBÉRCULOS

Tubérculos em bom estado foram golpeados junto aos pequenos gomos e mergulhados numa solução com 0,03 mM de GA durante uma hora. Seguidamente foram enterrados superficialmente em vasos com terra e colocados à luz (Li, 1985).

DESINFECÇÃO DOS EXPLANTES PROVENIENTES DA ESTUFA

Folhas, caules ou brolhos de batateira foram sujeitos às seguintes lavagens: etanol 70 % durante 5 minutos (min); lixívia 20 % durante 5 min; quatro lavagens em água autoclavada (no final o material biológico pode permanecer algum tempo em água autoclavada).

INDUÇÃO *IN VITRO* DE MICROTUBÉRCULOS DE *Solanum tuberosum* L.

Os explantes utilizados para a formação de microtubérculos consistiram em gomos provenientes de brolhos ou de caules, desenvolvidos *in vitro* ou no solo, de *Solanum tuberosum* L. Procurou-se obter segmentos com cerca de 1 cm que englobassem 1 gomo axilar.

Os meios experimentados (ver tabela 7) tinham em comum a elevada concentração de sacarose e a presença de benzilaminopurina (BA). Em relação ao meio K quando o gomo axilar desenvolvia um caule branco e estiolado era transferido para meio K1.

Até os microtubérculos terem atingido um tamanho razoável transferiram-se de meio a intervalos de cerca de um mês. A tuberização ocorreu em condições de obscuridade e temperatura constante de 26º C.

Tabela 7 – Composição dos meios utilizados para a indução de microtubérculos *in vitro*.

Meio	Composição	Fonte
D	Sais MS; vitaminas MS; 4,5 mg/L BA; 8 % sacarose; 0,7 % agar; pH 5,8.	Xu *et al*, 1998
H	Sais MS; 1 mg/L tiamina HCl; 0,5 mg/L piridoxina HCl; 0,5 mg/L ácido nicotínico; 0,1 mg/L GA3; 5 mg/L BA; 8 % sacarose; 0,7 % agar; pH 5,8.	Silva *et al*, 2001
K/K1	K: Sais MS; vitaminas MS; 0,1 mg/L cinetina; 0,2 mg/L GA3; 1,5 % sacarose; 7 % agar; pH 5,8. K1: Sais MS; vitaminas MS; 2 mg/L BA; 1 g/L CCC; 6 % sacarose; 0,7 % agar; pH 5,8.	Pereira, 1998

ARMAZENAMENTO DE MICROTUBÉRCULOS FORMADOS *IN VITRO*

Microtubérculos obtidos a partir de brolhos em meio D foram colhidos e armazenados em condições de esterilidade num local seco e fresco, em obscuridade.

Microtubérculos obtidos a partir de caules em meio D, H e K1 foram, juntamente com o caule onde se formaram, transferidos para um meio de armazenamento – meio S – que consiste em sais MS, vitaminas MS, 40 g/L de sorbitol, 25 g/L de sacarose, 0.7 % de agar, a pH 5.6. Foram armazenados num local seco e fresco, em obscuridade (Golmirzaie *et al*, 1997-98).

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE GOMOS AXILARES

Os gomos axilares utilizados inicialmente provinham de batateiras cultivadas em estufa com fotoperíodo de 16 horas (h) e temperatura constante de 26º C. Mais tarde utilizaram-se apenas explantes produzidos *in vitro*.

Os explantes consistiam em segmentos de caule com 1 cm com um gomo axilar. Foram colocados em tubos de cultura (Sigma) com o gomo axilar voltado para a superfície e ambas as extremidades dos segmentos em contacto com o meio. A incubação ocorreu em estufa com fotoperíodo de 16 horas e temperatura constante de 26º C.

O meio utilizado consistia em sais MS, 2 mg/L de glicina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L piridoxina HCl, 0,4 mg/L tiamina HCl, 0,25 mg/L ácido fólico, 0,05 mg/L D-biotina, 100 mg/L mio-inositol, 0,02 mg/L ácido acético naftaleno (NAA), 3 % sacarose, 0,7 % de agar, a pH 5,6 (Chang *et al*, 2002) – meio I.

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

Folhas cultivadas *in vitro* foram cortadas a toda a volta de forma a produzir discos foliares com cerca de 1 cm de lado. Estes foram colocados de lado num meio J que continha sais MS, vitaminas MS, 5 mg/l zeatina, 0,1 mg/L NAA, 6 % sacarose, 0,7 % agar, a pH 5,7 (Sidorov *et al*, 1999).

A incubação ocorreu em estufa com fotoperíodo de 16 horas e temperatura constante de 26º C.

Os explantes foram transferidos para meio novo a intervalos de 15 dias.

TRANSFERÊNCIA DE PLÂNTULAS *IN VITRO* PARA TERRA

Plântulas produzidas *in vitro* foram transferidas, em condições de esterilidade, para frascos de 1 litro com terra autoclavada. Os frascos foram selados com filme transparente com filtro (Sigma) e colocados em estufa com fotoperíodo de 16 horas e temperatura constante de 26º C. Ao fim de três semanas envasaram-se.

CULTURA E ARMAZENAMENTO DE *Agrobacterium tumefaciens*

Cultivou-se *A. tumefaciens* em vários meios, descritos na tabela 2, aos quais se acrescentou diversos antibióticos a diferentes concentrações segundo o objectivo pretendido. O antibiótico espectinomicina a 100 μg/mL de meio selecciona agrobactérias LBA4404 ELECTROMAX que possuem o plasmídio Ti "helper" pAL4404 onde se encontra o gene de resistência a este antibiótico. A selecção de agrobactérias transformadas com pCAMBIA 1302 fez-se por intermédio de canamicina a 50 μg/mL de meio.

Tabela 8 – Composição dos meios utilizados para a cultura de agrobactérias.

Meio	Composição	Fonte
YM	0,04% de extracto de levedura; 1,0% de manitol; 1,7 mM NaCl; 0,8 mM $MgSO_4.7H_2O$; 2.2 mM de $K_2HPO_4.3H_20$; pH 7,0; autoclavado.	Protocolo que acompanha as agrobactérias LBA4404 ELECTROMAX da *GIBCO BRL – Life Tecnologies™*
YEP	5 g/L de NaCl; 10 g/L de extracto de levedura; 0,5 g/L $K_2HPO_4.3H_20$; pH 7,5; autoclavado; 10g/L de peptona filtrada.	http://www.bioprotocols.com/protocolstools
YEP1	5 g/L de NaCl; 10 g/L de extracto de levedura; 0,5 g/L $K_2HPO_4.3H_20$; 0,2 g/L de $MgSO_4$; pH 7,5; autoclavado; 10g/L de peptona filtrada.	Modificado a partir de http://www.bioprotocols.com/protocolstools
LB1	Meio *Luria Broth Base* da *GIBCO BRL – Life Tecnologies™*; 0,2 g/L $MgSO_4$; pH 7,5; autoclavado.	

Para desenvolvimento, as culturas foram colocadas a 28ºC com agitação por períodos de cerca de 16 horas. Para isolamento de colónias procedeu-se ao plaqueamento das bactérias, nos meios indicados na tabela 8 suplementados com antibiótico em conformidade com o objectivo pretendido, por espalhamento de uma pequena quantidade de cultura sobre o meio. Após crescimento durante 4 – 5 dias a 28ºC, uma colónia era isolada para crescimento em meio líquido.

A partir de cultura líquida proveniente de uma única colónia separaram-se alíquotas para armazenamento em glicerol 87% a –70ºC. Foram experimentadas as relações agrobactérias/glicerol 80/20 (v/v) e 50/50 (v/v).

TRANSFORMAÇÃO DE AGROBACTÉRIAS LBA4404 ELECTROMAX

A transformação de agrobactérias da estirpe *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electromax, da Invitrogen com pCAMBIA 1302 seguiu o protocolo proposto em http://www.bioprotocols.com/protocolstools, de que se faz uma breve descrição.

Fez-se a incubação de colónias individualizadas de agrobactérias em meio LB suplementado com 0,2 g/L de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) - LB1 – com 100 μg/mL de espectinomicina, durante cerca de 15 horas (ON), a 28º C em tubos "falcon" de 50 mL. A agitação dos tubos "falcon" é um factor essencial. Deve ser grande se se quiser evitar que as agrobactérias cresçam em aglomerados. Os tubos "falcon" foram colocados soltos dentro de vasilhas (10 por 15 cm) acondicionados com papel. O agitador foi regulado para um número de rotações elevado. Os aglomerados (semelhantes a farrapos) que surgiram na cultura bacteriana homogénea e densa deixaram-se depositar e nunca foram utilizados.

Desta cultura retiraram-se 4 ml que se adicionaram a 50 mL de meio LB1 num matraz de 250 mL. Colocaram-se a agitar até se ter atingido uma densidade óptica a 600 nm entre 0,5 a 1. O ponto de referência são as 4 horas (h) mas podem ser necessárias entre 6 a 8 h.

Centrifugou-se a cultura bacteriana homogénea sem aglomerados a 4500 min^{-1} durante 5 min à temperatura ambiente (RT). Ressuspendeu-se a pellet em 10 mL de NaCl 0.15 M autoclavado, armazenado a 4º C, e centrifugou-se a 4500 g durante 5 min à RT. Adicionou-se 1 mL de $CaCl_2$ 20 mM autoclavado para completar a competência das agrobacteria.

A 200 μL de agrobacteria competentes adicionou-se 10 μg de pCAMBIA 1302. Na prática funciona a adição de 1 preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 proveniente de *E. coli* estirpe DH5α. Incubou-se em gelo durante 30 min. Acentuou-se o choque térmico congelando as células em azoto líquido durante 1 min e 15 segundos (s). De seguida transferiu-se rapidamente os tubos "eppendorf" para um banho a 37º C onde permaneceram 5 a 6 min.

A recuperação das agrobacteria conseguiu-se incubando-as em LB1 fresco a 28º C durante 4 h. No final, centrifugou-se durante 5 min a 3000 g, à RT. Ressuspendeu-se em 200 μL de LB1 fresco e repicou-se em placas de LB1 com 100 μg/mL de espectinomicina e 50 μg/mL de canamicina. Incubou-se a 28º C durante 5 dias. As colónias de agrobactérias são relativamente pequenas e pouco numerosas mas em tudo semelhantes às de *E. coli*.

PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE ALCALINA PARA AGROBACTÉRIAS LBA4404 TRANSFORMADAS COM PCAMBIA 1302

O procedimento utilizado foi adaptado de Birnboin e Doly (1979), tendo como princípio básico o rompimento da parede celular por tratamento com uma solução alcalina.

Previamente incubaram-se colónias individualizadas de agrobacteria transformadas com pCAMBIA 1302 em meio LB1 com 50 μg/mL de canamicina, ON a 28º C. A agitação dos tubos "falcon" foi um factor essencial. Foi grande e os possíveis aglomerados que se formaram não foram utilizados.

Começou-se por concentrar, por centrifuçação, a cultura bacteriana no fundo de um tubo de centrífuga de 1,5 mL. Ressuspendeu-se este sedimento em 200 μL de solução I (50mM glucose, 25mM Tris, 10mM NaEDTA), a que se adicionou 10 μL de lisozima 10 mg/ml e 2 μL de RNAse A 10 mg/mL. A lisozima auxilia na fragilização da parede celular das agrobactérias. A RNAse A degrada o RNA que inevitavelmente se libertará juntamente com o plasmídio.

Após uma incubação em gelo durante 10 min adicionaram-se 400 μL de solução II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) fresca. Esta solução alcalina é a grande responsável pela lise bacteriana. Em seguida uma nova incubação em gelo, durante 10 min, e adição de 300 μL de solução III (3 M acetato de potássio, pH 4,8 (11,5% de ácido acético 100%)) neutraliza a solução II.

Uma incubação em gelo durante 10 min, seguida de centrifugação a 4º C durante 20 min a 11000 g levam à ascenção do plasmídio e outros resíduos para o sobrenadante. 0,7 vol. de isopropanol gelado promovem a percipitação dos ácidos nucleicos.

Os passos seguintes consistiram numa centrifugação a 4º C durante 30 min a 11000 g , na secagem do sedimento ao ar, RT e na sua ressuspensão em 50 μL de água.

As preparações de plasmídio de agrobactérias apresentavam muitos resíduos tendo-se procedido à transformação de *E. coli* DH5α com 5 μL destas preparações de plasmídio e manipulação do pCAMBIA 1302 a partir de preparações de plasmídio de DH5α. Em alternativa podia-se prosseguir com a extracção de DNA com fenol/clorofórmio e lavagem com etanol. O rendimento era reduzido mas suficiente e a pureza elevada.

EXTRACÇÃO DO pCAMBIA 1302 POR FENOL/CLOROFÓRMIO E LAVAGEM COM ETANOL

O fenol e o clorofórmio são responsáveis pela eliminação de proteínas contaminantes. Neste trabalho utilizou-se um reagente mono-fásico de fenol e

isotiocianato de guanidina com a designação comercial de TRIZOL (Gibco BRL). Por sua vez a lavagem com etanol remove os inevitáveis resíduos de clorofórmio.

Diluiram-se as preparações de plasmídio de agrobactérias de forma a obter um volume final de 100 μL ao qual se adicionaram 0,5 – 1 vol. de TRIZOL. Agitou-se um pouco no vortex para promover uma maior homogeneização. Uma centrifugação de 1 min, RT, a 14000 g levou à deposição de parte dos contaminantes. Adicionou-se 0,5 - 1 vol. de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) ao sobrenadante e novamente se agitou no vortex e se centrifugou.

Fez-se uma lavagem adicionando ao sobrenadante 1 mL de EtOH 70 % seguida de centrifugação durante 30 min a 4º C. Lavou-se o sedimento com 0,5 ml de EtOH 70 %. Centrifugou-se a 4º C, durante 10 min, a 11000 g. Secou-se o sedimento ao ar para evaporar todo o etanol e ressuspendeu-se em 30 μL de água estéril.

TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404 DE GOMOS AXILARES DE *Solanum tuberosum* L. COM pCAMBIA 1302

O procedimento de transformação de gomos axilares *in vitro* utilizado foi adaptado do trabalho de Beaujean *et al.* (1998).

Os explantes consistiram em fragmentos de caule com cerca de 1 cm com um gomo axilar, cortados longitudinalmente e sem folha inserida nesse verticilo.

Incubaram-se os explantes, durante 30 min, em 30 mL de meio MS (3 % sacarose, pH 5,7) contendo 1:10 vol. de suspensão bacteriana. As agrobactérias foram incubadas durante cerca de 15 h a 28º C em meio LB1 sem antibiótico. Antes de se transferir os explantes para meio I, descrito anteriormente, secaram-se em papel de filtro. A face cortada dos explantes foi colocada em contacto com o meio.

Depois de 2 ou 3 dias de cocultivação procedeu-se à lavagem dos explantes em meio MS (3 % sacarose, pH 5,7) suplementado com 100 μg/mL de augmentina, durante 30 min. A augmentina é um antibiótico derivado da penicilina que elimina agrobacteria. Após a secagem dos explantes em papel de filtro colocaram-se em meio I com 50 μg/mL de augmentina e 25 μg/mL de higromicina B. Este antibiótico selecciona as plantas transformadas com pCAMBIA 1302 que possui o gene *hptII* que permite a resistência a este antibiótico.

Passados 10 dias trocaram-se os explantes para meio I apenas com 50 μg/mL de augmentina. Fez-se a renovação do meio de 15 em 15 dias.

TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404 DE DISCOS FOLIARES DE *Solanum tuberosum* L. COM pCAMBIA 1302

As agrobactérias foram inoculadas durante 24h em meio LB1 sem antibiótico.

Folhas cultivadas *in vitro* foram cortadas a toda a volta de forma a produzir quadrados foliares com cerca de 1 cm de lado.

Fez-se a cocultivação dos discos foliares em 30 mL de meio MS (2 % sacarose, pH 5,7) contendo 500 μL de cultura bacteriana, durante 2 dias em condições de obscuridade.

Os discos foliares sujeitos a infecção foram lavados em meio MS (2% sacarose, pH 5.7) suplementados com 100 μg/mL de augmentina durante 30 min e secos em papel de filtro. Fez-se a incubação em meio J, já descrito, suplementado com 15 μg/mL de higromicina e 100 μg/mL de augmentina. A incubação dos explantes realizou-se tanto em meio sólido com líquido. Transferiram-se os explantes para novo meio cada 10 dias.

ANÁLISES MOLECULARES PARA CONFIRMAÇÃO DA TRANSGENIA

Extracção de RNA Total e de DNA Genómico

A extracção de DNA genómico foi realizada utilizando o *kit Trizol Reagent, total RNA isolation reagent da GibcoBRL – Life Technologies*^{TM}. Todo o material de vidro e de plástico utilizado na extracção do RNA, bem como a água foram tratados com DEPC a 0,1 % (v/v) durante 18 horas e autoclavado em seguida. O material e água utilizados no isolamento do DNA foram autoclavados ou filtrados.

Num almofariz previamente aspergido com clorofórmio fez-se a homogeneização de cerca de 100 mg de tecido em 1 mL de reagente *Trizol*. De maneira a permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos incubaram-se as amostras 5 min, RT. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio. Agitaram-se vigorosamente os tubos 15 sec e incubaram-se mais 3 min, RT. Posteriormente, centrifugaram-se a 12000 *g* durante 15 min. Após a centrifugação, a mistura apresentava três fases , o RNA encontrava-se na fase superior, aquosa, que apresentava uma coloração transparente. Parte substancial desta fase foi transferida para um novo tubo (é importante evitar contaminações com DNA genómico) e o RNA foi percipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol e incubação,RT, ON. Findo este tempo, centrifugaram-se a 12000 *g* durante 10 min. Removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com etanol 75%: agitou-se e centrifugou-se a 7500 *g* durante 5 min. Deixou-se secar o sedimento ao ar e dissolveu-se

o RNA em 20 μL de água tratada com DEPC. Por último, incubaram-se as amostras durante 10 min a 60ºC para ressuspender o RNA.

O isolamento do DNA genómico das duas fases inferiores ocorreu após a remoção completa da fase aquosa. A precipitação do DNA consistiu na adição de 0,3 mL de etanol 100% e inversão repetida dos tubos. Incubaram-se os tubos 3 min, RT e sedimentou-se o DNA numa centrifugação a 2000 *g* durante 5 min. Procedeu-se a três lavagens do sedimento com 1 mL de uma solução 0,1 M de citrato de sódio em 10% etanol. A cada lavagem, o sedimento foi incubado durante 30 min à RT (com agitação periódica) e centrifugado a 2000 *g* durante 5 min. O sedimento foi ressuspendido em 1,5 mL de etanol 75% e incubado 15 min, RT, com agitação periódica. Findo este tempo, realizou-se uma centrifugação a 2000 *g* durante 5 min. O sedimento foi seco ao ar e dissolvido em 100 μL de NaOH 8 mM.

Análise do DNA Genómico

Para detectar a presença do cDNA da GFP procedeu-se à realização de um PCR do DNA genómico de tecido caloso transformado recorrendo ao iniciadores F35S a 5' e RNos a 3'. O iniciador F35S (5' CCAAGCTTGGCATGGAGTCAAAGATTCAAA) é complementar da região inicial do promotor CAMV35S, entre nucleótido 10006 e o 10025 (Tm = 66.8). O iniciador RNos (5' CGGAATTCCGCCCGATCTAGTAACATAGAT3') é complementar da região final da terminação Nos 3'-UTR, entre os nucleótidos 1009 e 1038 (Tm = 67.2).

Para a realização da reacção de PCR recorreu-se ao *kit Ready-To-Go™ PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*. O resumo da composição básica destas reacções de PCR encontra-se representado na tabela 9. O programa utilizado é semelhante ao programa descrito na tabela 10.

Tabela 9 – Resumo da composição básica das reacções de PCR (volume final 25 μL) utilizando o *kit Ready-To-Go™ PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*

Reagente	Volume por tubo
Iniciador a 5´a 20μM	1 μL
Iniciador a 3' a 20 μM	1 μL
$MgCl_2$ 25 mM da *FERMENTAS*	0,5 μL (0,5 mM) (2)
DNA-molde (1)	25 ng (2)
Água esterilizada	completar o volume final

(1) Antes da execução das amostras procedeu-se à fervura durante 5 min do DNA.

(2) Campilho, A. *et al.* (1999).

Tabela 10 - Programa de PCR geral após aplicação da DNA polimerase.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
35 X	94ºC	1 min
	60ºC	30 sec
	72ºC	2 min
1x	72ºC	7 min
1x	4ºC	manter

Análise do RNA total

A presença de mRNA relativo a GFP foi detectada por RT-PCR. O primeiro passo deste procedimento consistiu na obtenção da primeira cadeia de cDNA, sintetizada utilizando a transcriptase reversa de modo a originar o molde necessário para o primeiro ciclo de PCR.

Para a síntese da primeira cadeia foi utilizado o *kit Ready-To-Go™ You-prime First-Strand Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*. Num microtubo adicionou-se 1 μg de RNA para um volume final de 30 μL de água tratada com DEPC. Incubou-se a 65ºC durante 10 min. Após este período colocou-se o microtubo em gelo durante 2 min. O conteúdo do microtubo foi transferido, sem agitar, para um novo microtubo, fornecido pelo *kit* que continha todos os reagentes liofilizados para a reacção. Foi adicionado 1,5 μL de iniciador RGFP*Xho*I (ver *Material e Métodos* do *CAPÌTULO 1*) e água com DEPC até perfazer 33 μL. Misturou-se suavemente e centrifugou-se brevemente. A mistura foi deixada a incubar durante 1 min à temperatura ambiente. Após este período foi a incubar durante 60 min a 37ºC.

Realizou-se em seguida um PCR sobre a primeira cadeia de cDNA de GFP. Para a realização da reacção de PCR recorreu-se ao *kit Ready-To-Go™ PCR Beads* da *Amesham Pharmacia Biotech*. O resumo da composição básica destas reacções de PCR encontra-se representado na tabela 9, tendo-se utilizado duas concentrações de $MgCl_2$ e 1 μL da reacção descrita acima. O programa utilizado é semelhante ao programa descrito na tabela 10.

OBSERVAÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

Para a observação de fluorescência as plantas foram excitadas com luz UV num transiluminador com comprimento de onda 312 nm. Procedeu-se, ainda, à observação de preparações extemporâneas de folhas e tecido caloso ao microscópio de fluorescência (LEICA, modelo DMLB). As preparações foram fotografadas (máquina LEICA) com filtro FITC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os três meios indutores de tuberização experimentados (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) conduziram à formação inicial, em obscuridade, de brolhos estiolados e brancos com folhas rudimentares escamiformes (ver figura 16). A indução e crescimento destes brolhos ocorreu com relativa rapidez: no espaço de cerca de duas semanas. O alongamento dos brolhos cessou quando se começaram a desenvolver os microtubérculos. Tal como verificado em trabalhos anteriores (Pereira, 1998), nunca foi observada a formação de microtubérculos em meio K, sendo necessária a transferência dos brolhos para meio K1.

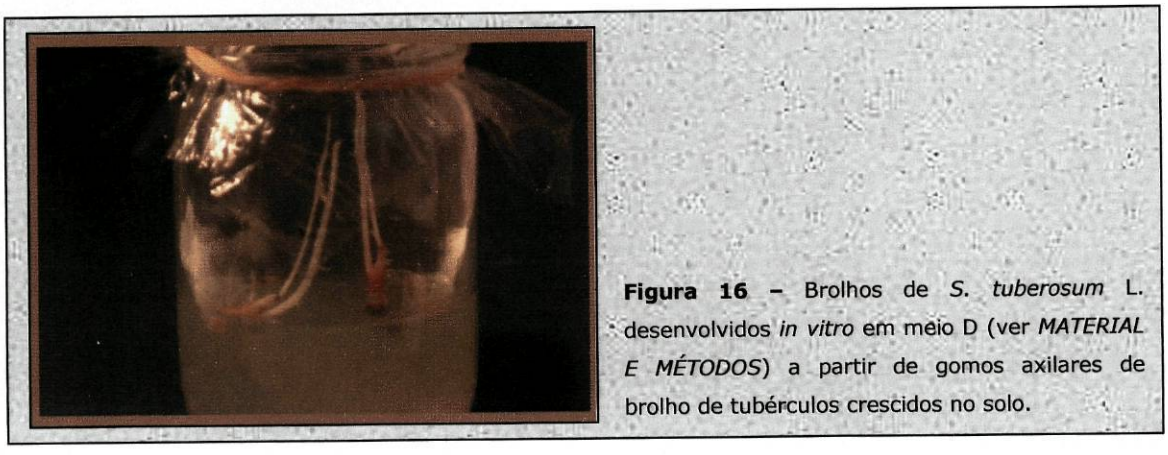


Figura 16 – Brolhos de *S. tuberosum* L. desenvolvidos *in vitro* em meio D (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de gomos axilares de brolho de tubérculos crescidos no solo.

Como se pode observar nas fotografias apresentadas, o tamanho dos microtubérculos induzidos a partir de gomos axilares desenvolvidos *in vitro* (ver figura 18) é inferior aos de tubérculos crescidos no solo (ver figura 17). Provavelmente estes últimos já tinham sofrido a indução de tuberização antes de serem transferidos para meio *in vitro*.

O desenvolvimento dos microtubérculos ocorreu por vezes na zona terminal dos brolhos estiolados e brancos, mas o mais frequente foi surgirem nos gomos axilares destes brolhos. O pequeno brolho que se formava por baixo da folha rudimentar escamiforme começava a alargar e passado entre um e dois meses desenvolvia-se um microtubérculo envolvido por uma periderme castanha e com pequenos "olhos". Também se verificou a formação de microtubérculos a partir de brolhos secundários. Alguns brolhos estiolados não produziram qualquer microtubérculo enquanto outros produziram mais que um.

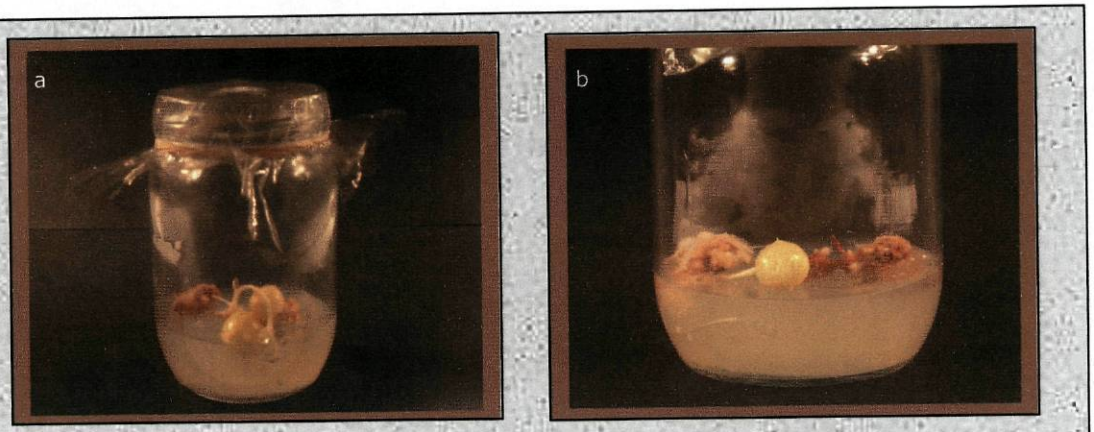


Figura 17 – Aspecto de microtubérculos de *S. tuberosum* L. desenvolvidos *in vitro* em meio D (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de gomos axilares de brolho proveniente de tubérculos crescidos no solo.



Figura 18 – Microtubérculos de *S. tuberosum* L. desenvolvidos *in vitro* nos meios K/K1 (a), H (b) e D (c) (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de gomos axilares de caules aéreos desenvolvidos *in vitro*.

A nível das condições indutoras de tuberização os três meios, D, H e K/K1 (ver *MATERIAL E MÉTODOS)* eram razoavelmente similares. Percentagens altas de sacarose, na ordem dos 8%, promovem este processo ao contrariarem o efeito negativo das giberelinas endógenas do brolho (Fernie e Willmitzer, 2001 e ver *Culturas In Vitro* na *INTRODUÇÃO*). As citocininas são consideradas factores indutores de tuberização (Xu *et al*, 1998) visto promoverem este processo quando aplicadas exogenamente e ocorrerem em níveis elevados nos tecidos induzidos.

O meio K (ver *MATERIAL E MÉTODOS)* contém duas hormonas, uma giberelina e uma citocinina. Na presença de giberelina, a adição de citocinina resulta em brolhos mais curtos, tendo um efeito negativo no alongamento destes. Hussey *et al.* (1984) defendem que as citocininas favorecem a tuberização, contrariando o efeito das giberelinas ao bloquear o alongamento excessivo dos brolhos. Quando estes estão desenvolvidos podem ser facilmente

induzidos para tuberizarem em condições adequadas. O meio K1, para além de níveis médios de sacarose e a presença de citocininas, contém CCC que reforça a acção das citocininas ao reduzir a síntese de giberelinas endógenas.

A tuberização apenas foi experimentada em condições de obscuridade à temperatura constante de 26ºC tendo sido estas as condições escolhidas após pesquisa bibliográfica (ver *INTRODUÇÃO*).

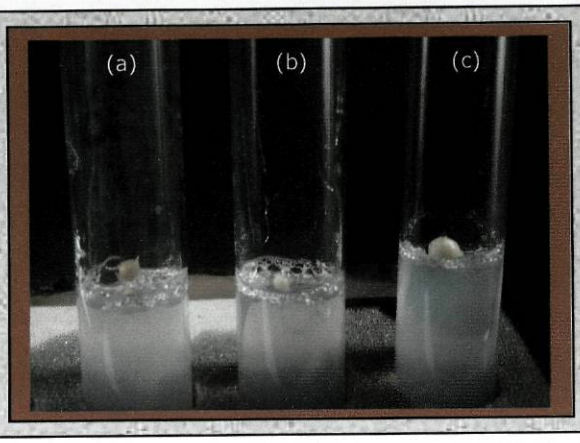


Figura 19 - Microtubérculos de *S. tuberosum* L. desenvolvidos *in vitro* nos meios H (a), K1 (b) e D (c) armazenados em meio S com cerca de 1 mês (ver *MATERIAL E MÉTODOS* para composição dos meios).

Os microtubérculos armazenados *in vitro* apresentavam um pequeno desenvolvimento dos gomos ou "olhos" que se manteve estável passado duas a três semanas (ver figura 19).

O procedimento adoptado, adaptado de Golmirzaie *et al.* (1997-98) apresenta como principais factores para a indução de dormência destes órgãos da batateira o sorbitol, um retardador de crescimento, assim como as baixas temperaturas. A absorção de carbono foi mantida ao suplementar o meio com açúcar. Reduzir a intensidade luminosa afectou a taxa de crescimento ao reduzir os requerimentos fotossintéticos e consequentemente o metabolismo.

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE GOMOS AXILARES

O desenvolvimento de caules a partir de gomos axilares é rápido e eficiente sendo apenas necessário o fornecimento de uma auxina, o ácido naftaleno (NAA), para promover o seu crescimento (ver figura 20). Os gomos provenientes de terra assim como de plantas formadas *in vitro* apresentam os mesmos resultados. Cerca de duas a três semanas mais tarde surgiram raízes na base do caule.

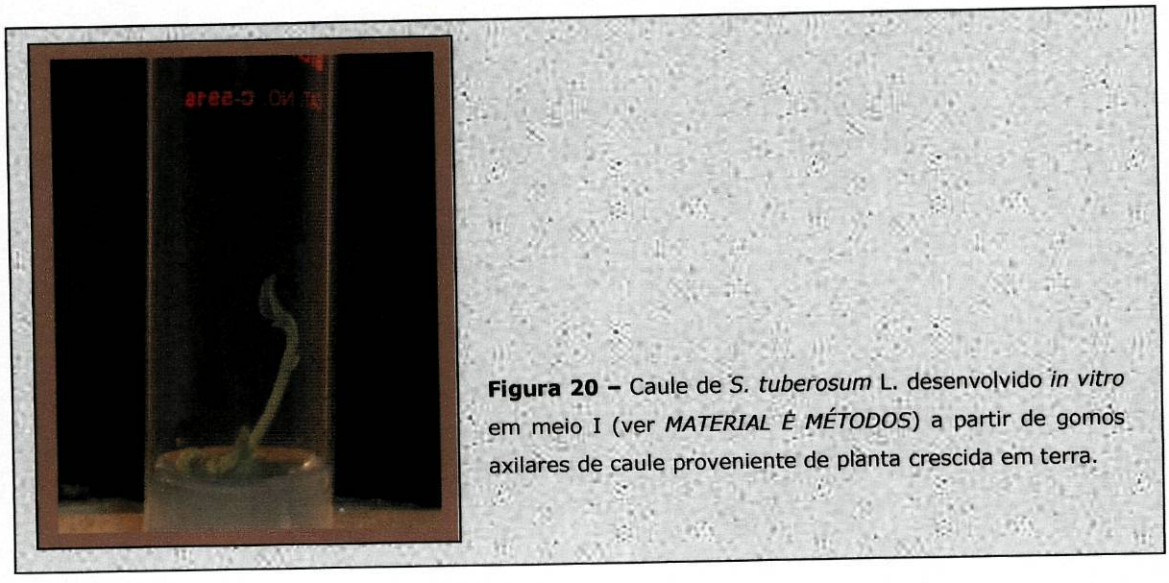


Figura 20 – Caule de *S. tuberosum* L. desenvolvido *in vitro* em meio I (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de gomos axilares de caule proveniente de planta crescida em terra.

As plantas desenvolveram-se sem alterações significativas relativamente às plantas selvagens quando colocadas em tubos que permitam arejamento. Quando se procurou produzir uma quantidade relativamente grande de plantas, os frascos de 1 L utilizados tiveram de ser vedados com parafilme para evitar contaminações com fungos. Este procedimento dificultava a arejamento levando a que as plantas crescidas nesta situação apresentassem pequenas raízes nos vários nós do caule, na posição do gomo axilar. Este aspecto acabou por ser aproveitado na produção de grandes quantidades de plantas *in vitro*, bastando seccionar os caules para regenerar plantas completas.

TRANSFORMAÇÃO DE GOMOS AXILARES DE *Solanum tuberosum L.* COM pCAMBIA 1302 MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS LBA4404

A transformação de gomos axilares evita a formação inicial de tecido caloso e, consequentemente, os níveis de variação somaclonal que lhe estão associados. Por outro lado, a manipulação de segmentos de caule é menos danosa para o explante que a de discos foliares. Os gomos axilares utilizados neste trabalho foram cortados longitudinalmente de forma a permitir uma infecção mais eficiente pelas agrobactérias. No entanto, como seria de prever pela literatura consultada a percentagem de transformação não foi muito elevada. O procedimento foi repetido três vezes com a cocultivação de cerca de vinte gomos axilares com agrobactérias. Das três vezes, apenas 2 a 4 plantas sobreviveram em meio suplementado com os antibióticos augmentina e higromicina B. As plantas não se desenvolveram em plântulas de tamanho normal e acabaram por perecer ao fim de cerca de

1-1,5 meses. Este efeito foi mais dramático quando se utilizaram gomos axilares muito jovens e pouco desenvolvidos.

A sobrevivência das plantas foi semelhante quando se utilizaram concentrações de higromicina B, o antibiótico de selecção nas plantas, de 50 ou 25 μg/mL. Plantas não transformadas pereceram ao fim de duas semanas em meio com uma concentração de 25 μg/mL de higromicina B.

A melhoria da recuperação das plantas transgénicas talvez pudesse ser conseguida com a adição da citocinina zeatina ao meio I (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) o que permitiria uma considerável redução da formação de tecido caloso, acelerando a formação de caules transgénicos (Beaujean *et al*, 1998). Desta forma contrariava-se a retardação da diferenciação celular provocada pela possivelmente excessiva concentração de antibiótico já que, diminuir a concentração do antibiótico de selecção de transgenia pode ser pernicioso ao permitir a sobrevivência de todas as plantas.

Outra solução que poderia ser igualmente válida seria a transferência das plantas transgénicas para meio sem antibióticos depois de uma incubação prévia em meio com o antibiótico de selecção, e posterior verificação da transgenia quando a planta se desenvolvesse razoavelmente. Todavia quando se seguiu esta abordagem, as agrobactérias voltaram a crescer, possivelmente como resultado de uma deficiente lavagem dos explantes depois da cocultivação, aliada ao facto de parte do explante se encontrar acima do meio e não estar sujeito à acção de augmentina, antibiótico responsável pela eliminação de agrobactérias, no meio de selecção.

No entanto, o factor que mais pode ter contribuído para o deficiente desenvolvimento das batateiras transgénicas estará relacionado com a provável produção elevada de GFP, cujo cDNA está sob o controlo de um promotor forte - o CaMV35S, o que pode ser prejudicial à planta. A expressão elevada de GFP no citoplasma das células provoca alguma toxicidade e interfere com a diferenciação vegetal, visto ser uma molécula fluorescente que está sujeita a alterações oxidativas e possui propriedades catalíticas (para citações ver Haseloff *et al*, 1998).

Este resultado apoia a hipótese da toxicidade da GFP citosólica codificada pelo pCAMBIA 1302 sugerida em trabalhos anteriores deste laboratório (Coelho, 2002) em que, no tabaco, se verificou que o crescimento das plantas transgénicas era bastante afectado.

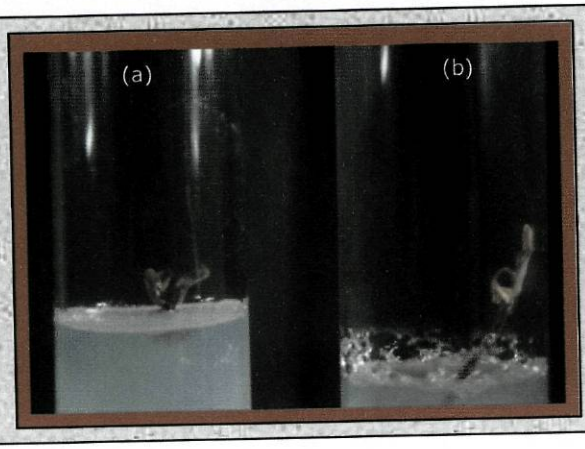


Figura 21 – Plantas de *S. tuberosum* L. desenvolvidas *in vitro* em meio I suplementado com 50 μg/mL de augmentina e 25 μg/mL de higromicina B. (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de gomos axilares de caule. (a) planta transformada com pCAMBIA 1302; (b) planta não transformada.

A transgenia foi verificada por observação de folha de planta transformada com agrobactérias num transiluminador com iluminação por luz UV (λ = 312 nm). Na figura 21 observa-se a fluorescência da GFP quando excitada com UVs na planta transgénica (a). A fluorescência é um pouco mais intensa na nervura principal do que no mesófilo, o que se deve à autofluorescência da lenhina da parede secundária do xilema. Esta mesma razão justifica a autofluorescência verificada na planta não transformada (b). Da comparação das duas folhas resulta a confirmação de que a fluorescência de (a) se deve à presença de GFP nas suas células, isto é, comprova-se a transformação da batateira (ver figura 22). Seria interessante no futuro realizar a comparação entre fluorescências de plantas de batateira transformadas com pCAMBIA 1302 original e com pCAMBIAΔGFP, o que poderia vir a consistir um melhor controlo.

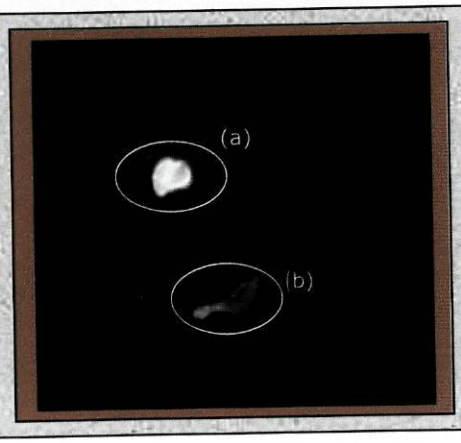


Figura 22 – Fotografia de folhas de *S. tuberosum* L. quando excitadas com UV (λ = 312 nm) durante 2 segundos no transiluminador. (a) folha proveniente de planta transformada com pCAMBIA 1302; (b) folha proveniente de planta não transformada.

INDUÇÃO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS A PARTIR DE DISCOS FOLIARES

O desenvolvimento de plântulas a partir de discos foliares revelou-se um processo demorado. A formação de tecido caloso é abundante e rápida: ao fim de poucos dias é visível a formação abundante de células indiferenciadas nos bordos dos discos foliares e passadas cerca de duas semanas praticamente todo o disco foliar está envolvido por tecido caloso (ver figura 23).

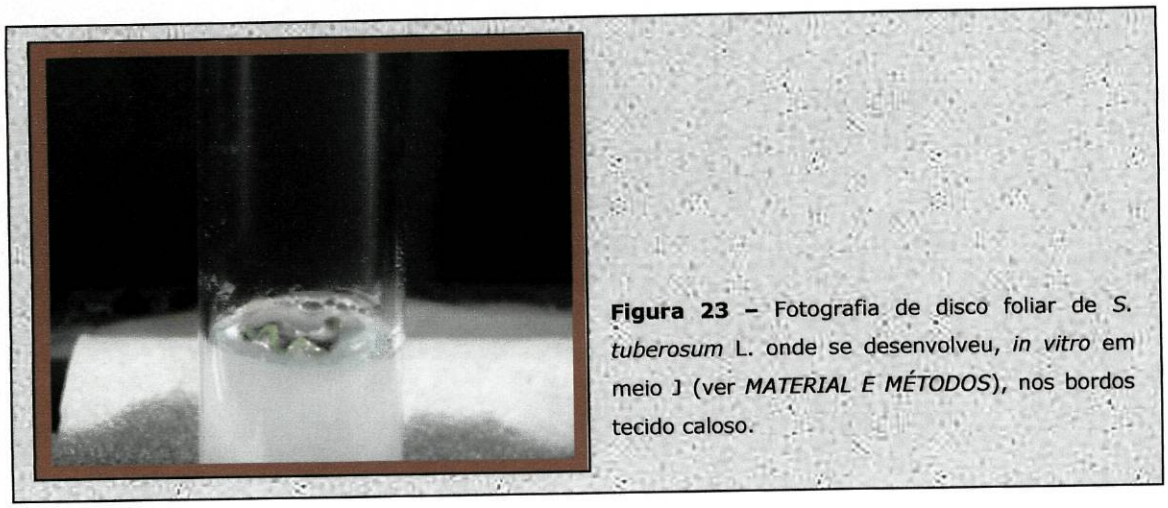


Figura 23 – Fotografia de disco foliar de *S. tuberosum* L. onde se desenvolveu, *in vitro* em meio J (ver *MATERIAL E MÉTODOS*), nos bordos tecido caloso.

Supõem-se que, nesta técnica, a plântula surge por uma forma de embriogénese somática indirecta visto as estruturas produzidas nesta situação, para além de apresentarem uma morfologia compatível, serem independentes do tecido caloso que lhes deu origem. Podem ser destacadas facilmente (Tisserat, B., 1987) e sobrevivem em meio nutritivo J (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). Este tipo de estruturas é favorecido num meio que combine auxinas e citocininas. As primeiras, neste caso NAA, favorecem a formação de tecido caloso e as segundas, neste caso zeatina, favorecem a diferenciação celular. Seria interessante retirar a auxina do meio ao fim de uma semana quando a formação de tecido caloso já ocorreu, para induzir uma maior diferenciação.

Este processo é também pouco eficiente: de cerca de 40 discos foliares conseguiram-se regenerar apenas 5 plântulas. Relativamente a outras batateiras desenvolvidas *in vitro* estas estruturas caulinares apresentam o mesmo aspecto (ver figura 24).

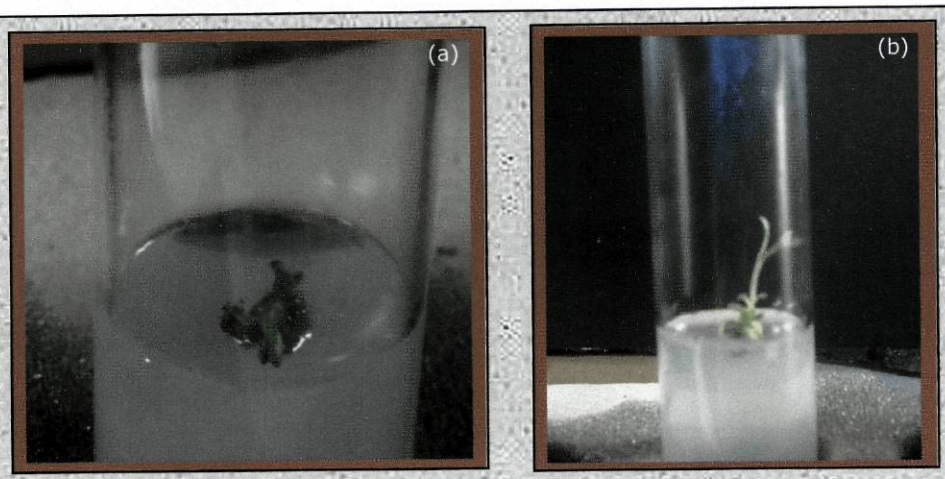


Figura 24 – Fotografia de estrutura embrionária (a) e caulinar (b) de *S. tuberosum* L. desenvolvida *in vitro* em meio J (ver *MATERIAL E MÉTODOS*) a partir de tecido caloso (a) e de estrutura embrionária (b).

TRANSFORMAÇÃO MEDIADA POR AGROBACTÉRIAS DE DISCOS FOLIARES DE *Solanum tuberosum L.* COM pCAMBIA 1302

Esta técnica compreende a infecção por agrobactérias de células de disco foliar que após uma transição como tecido caloso poderão regenerar plântulas. Como a taxa de eficiência da transformação é baixa muito do tecido caloso que se desenvolve neste meio pode não estar transformado.

Como se verificou que concentrações de 25 μg/mL de higromicina B contrariam a regeneração a partir de gomos caulinares decidiu-se utilizar para os discos foliares apenas 15 μg/mL. Embora se corra o risco de obter falsos positivos permite-se um meio propício à diferenciação de plântulas a partir de tecido caloso. É importante retirar a auxina do meio após a formação inicial de tecido caloso, para permitir a diferenciação de plântulas e evitar fenómenos somaclonais. Os possíveis danos provocados pela GFP apontados para os gomos caulinares devem verificar-se de igual modo com os discos foliares. A toxicidade da GFP podia ser contornada se se recorresse a uma variante da GFP direccionada para o retículo endoplasmático ou outro mutante de GFP menos deletério(ver *INTRODUÇÃO*).

Liu *et al* (1995) comprovaram, em relação a *Solanum brevidens* que a frequência de regeneração de caules transformados com agrobactérias LBA4404 era duas vezes maior em meio líquido comparativamente a meio sólido. Os argumentos que apresentam são o facto de toda a superfície do explante contactar o meio líquido o que promove o crescimento das células transformadas. Reportam ainda que o meio líquido produz caules mais vigorosos na

presença de antibiótico, comparativamente a meio sólido. Isto sugere que o antibiótico inibe de forma mais eficiente o crescimento de caules não transformados em meio líquido. O meio sólido apresenta ainda outra desvantagem. O explante quando começa a formar tecido caloso tem tendência a enrolar afastando-se do meio e da acção do antibiótico. A utilização de meio líquido, por sua vez, exige troca frequente de meio devido à senescência de células foliares sob a acção do antibiótico. Esta estratégia foi abordada neste trabalho (ver figura 25). O explante quando colocado em meio sólido começa a ficar necrosado na zona superior que não contacta com o meio. No meio líquido isto não acontece, daí a preferência por esta tipo de meio.

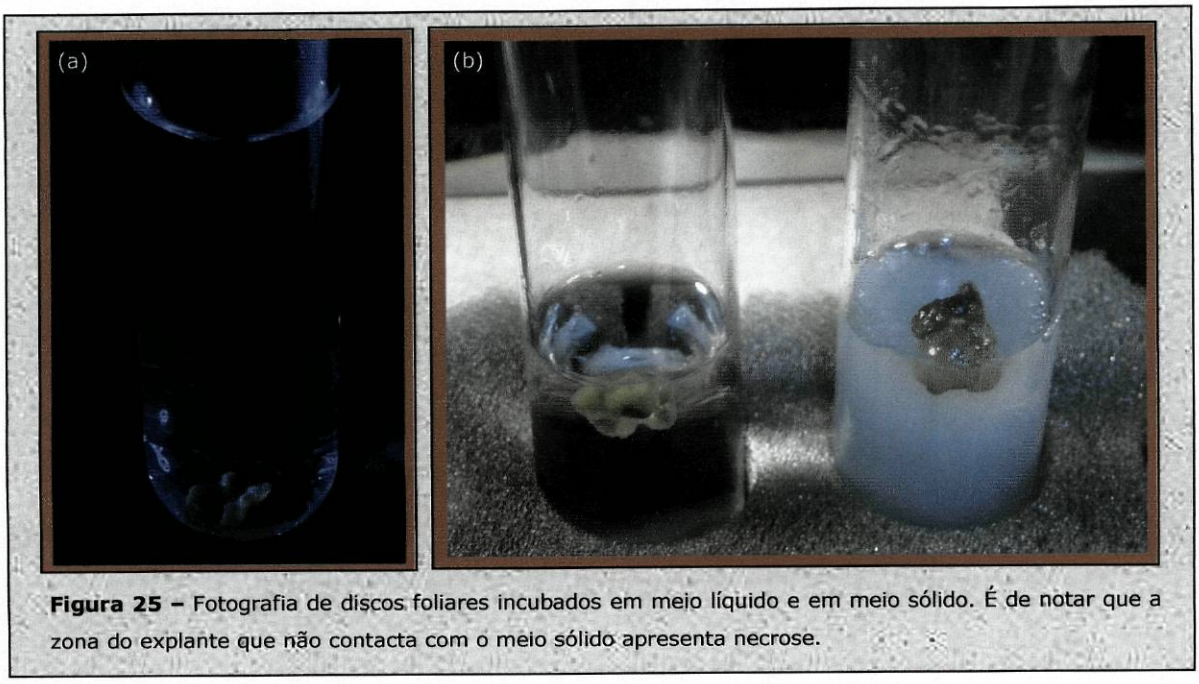


Figura 25 – Fotografia de discos foliares incubados em meio líquido e em meio sólido. É de notar que a zona do explante que não contacta com o meio sólido apresenta necrose.

Neste trabalho, apenas se pode documentar o desenvolvimento de tecido caloso transformado a partir de discos foliares. A transgenia foi verificada por observação de discos foliares transformados num transiluminador com iluminação por luz UV (λ = 312 nm) e comprovada por microscopia de fluorescência através de um microscópio de fluorescência *LEICA*, modelo DMLB. A fluorescência foi observada com a utilização de um filtro FITC. Executou-se, ainda, um PCR de DNA genómico utilizando como iniciadores sequências complementares do promotor CaM35S e da terminação Nos 3'-UTR que flanqueiam a GFP no pCAMBIA1302.

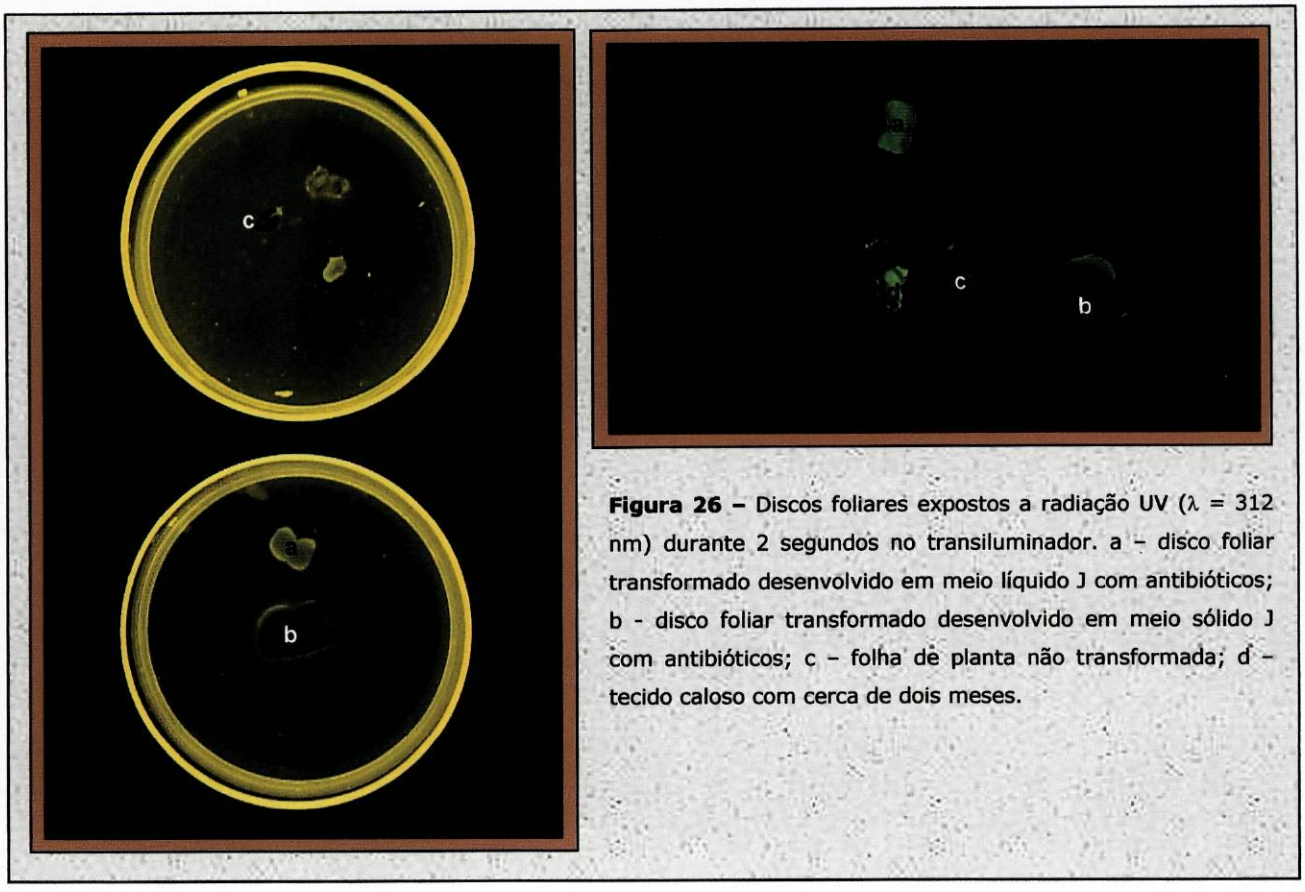


Figura 26 – Discos foliares expostos a radiação UV (λ = 312 nm) durante 2 segundos no transiluminador. a - disco foliar transformado desenvolvido em meio líquido J com antibióticos; b - disco foliar transformado desenvolvido em meio sólido J com antibióticos; c - folha de planta não transformada; d - tecido caloso com cerca de dois meses.

A análise da figura 26 pode não ser totalmente clara sobre a origem da fluorescência dos explantes transformados com pCAMBIA 1302. A comparação com a folha (c) (ver figura 26) salda-se num resultado positivo. A maior fluorescência dos explantes deve-se não à auto-fluorescência natural da lenhina da parede secundária do xilema e esclerênquima (Borlido *et al*, 2002) ou de metabolitos secundários mas sim da expressão da GFP. No entanto, quando a comparação se faz com uma porção de tecido caloso não transformado [(d) ver figura 26] verifica-se igual ou maior fluorescência neste. Como o primeiro tipo de células formadas pelos discos foliares transformados em meio com auxina é também tecido caloso era necessário perceber donde provinha a fluorescência do tecido caloso controlo. Procedeu-se, então, à observação dos explantes e controlos ao microscópio de fluorescência.

A clorofila quando excitada com luz fluorescente apresenta autofluorescencia vermelha (Borlido *et al*, 2002). A GFP fluoresce de verde. Quando ambas estão presentes no mesmo local a fluorescência surge amarela. A utilização de um filtro específico de emissão verde poderia eliminar a fluorescência vermelha das clorofilas (para citações ver Borlido *et al*, 2002).

O principal objectivo da observação ao microscópio de fluorescência foi elucidar a origem da fluorescência do tecido caloso controlo e dos explantes transformados. Quando se observou o tecido caloso controlo com luz branca verificou-se que em determinadas zonas surgiam células necróticas. Estas zonas fluoresciam de verde quando se aplicou o filtro FITC (ver figura 27). As zonas escuras concentravam metabolitos secundários que possuem autofluorescência verde. A expressão de GFP só poderia ocorrer em células vivas. O parênquima clorofilino do tecido caloso controlo apresentava fluorescência vermelha característica dos cloroplastos.

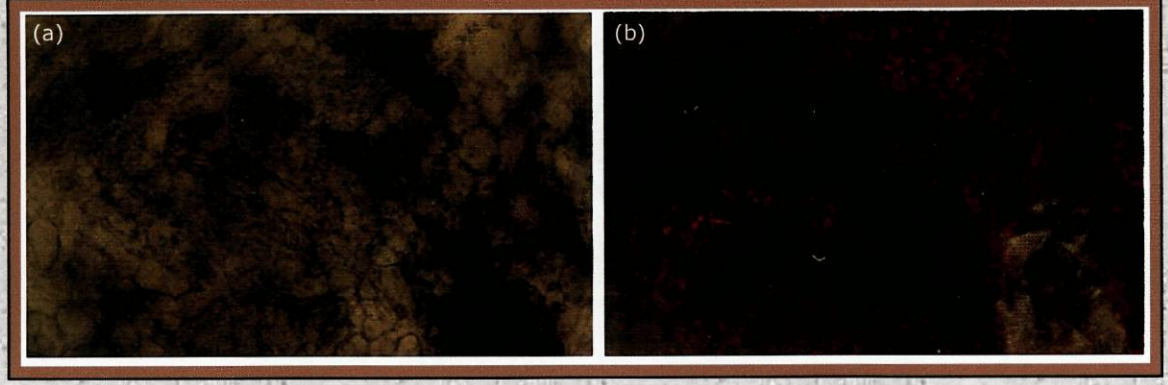


Figura 27 – Fotografias de tecido caloso não transformado com luz branca (a) e com luz fluorescente (b). A área iluminada e a ampliação (20x) são as mesmas. A mancha castanha observada em (a) fluoresce de verde (b).

A intensidade luminosa do tecido caloso controlo quando excitado por UVs resultou do facto do tecido caloso ser bastante antigo e possuir bastantes zonas mortas.

A observação de explante transformado incubado em meio líquido revelou uma zona de expressão da GFP nos ângulos formados pelas nervura principal e secundária (ver figura 28). Esta zona devia possuir pequenos cortes que as agrobactérias infectaram e consequentemente transformaram. Como é uma zona protegida as células recuperaram e originaram tecido caloso. Nas margens dos discos foliares também se observou fluorescência verde. No entanto, as células pareciam bastante danificadas. Nestas zonas a fluorescência devia derivar de metabolitos secundários.

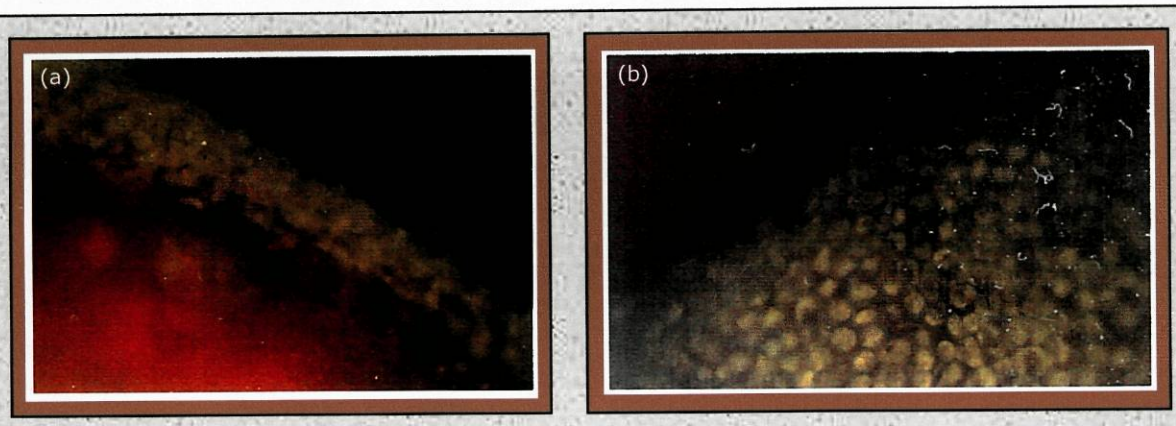


Figura 28 – Fotografias de um disco foliar transformado quando observado em microscopia de fluorescência com o filtro FITC. A imagem (a) evidencia a margem do explante. A imagem (b) evidencia uma área entre a nervura principal e uma nervura secundária. As células observadas são de tecido caloso transformado com pCAMBIA 1302.

A confirmação da transgenia por RT-PCR sobre o RNA total extraído de discos foliares transformados com pCAMBIA1302 não forneceu dados conclusivos porque o iniciador a 3' produz um amplificado inespecífico de tamanho inferior ao do cDNA de GFP (716 bp) [ver figura 29 (b)].

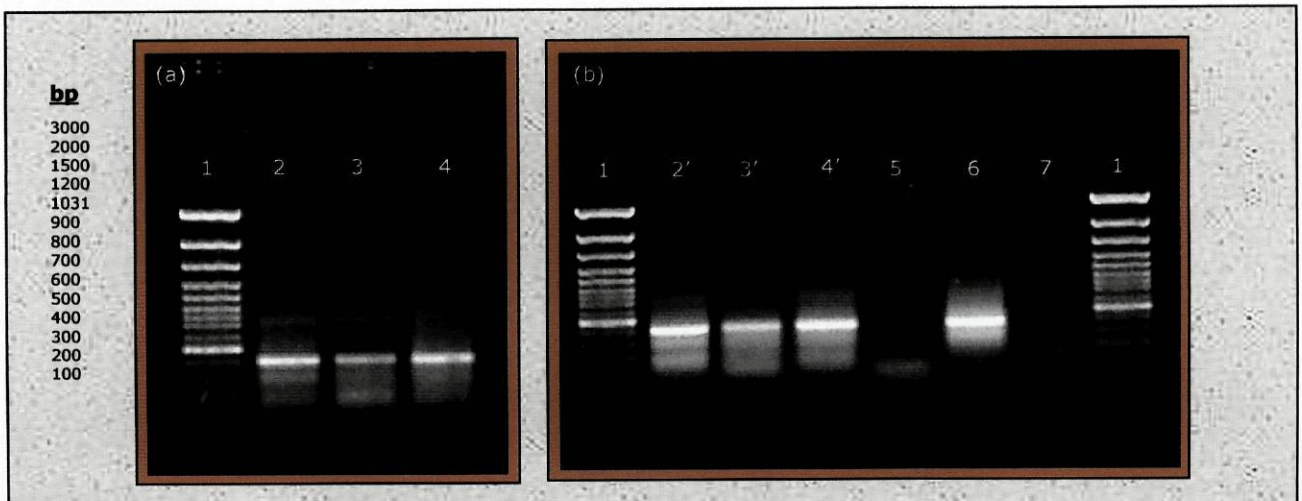


Figura 29 – Fotografias de gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, representando (a) o produto de RT-PCR de RNA total de disco foliar transformado com GFP (2 e 3) e não transformado (4) com os iniciadores FGFP e RGFP*Xho* I (ver *Material E Métodos* do *CAPÍTULO 1*); (b) repetição do RT-PCR (a) com um Tm mais elevado (58ºC) e uma concentração de MgCl2 de 3 mM. 1 – Generuler™ 100 bp DNA Ladder da *FERMENTAS* (marcador de pesos moleculares); 2 e 2' – produto de RT-PCR de RNA total extraído de disco foliar transformado incubado em meio líquido; 3 e 3' - produto de RT-PCR de RNA total extraído de disco foliar transformado incubado em meio sólido; 4 e 4' - produto de RT-PCR de RNA total extraído de disco foliar não transformado; 5 – controlo em que substituiu a primeira cadeia de CDNA por água; 6 – controlo em que apenas se utilizou iniciador a 3'; 7 – controlo em que apenas se utilizou iniciador a 5'. Ao lado encontra-se a lista dos tamanhos do marcador de pesos moleculares.

Este iniciador pode emparelhar com outro RNA ou com DNA genómico contaminante. Quando se experimentou uma temperatura de emparelhamento mais baixo e uma concentração de $MgCl_2$ menor conseguiu-se observar uma banda correspondente ao cDNA da GFP [ver figura 29 (a)]. O aumento da concentração de $MgCl_2$ diminui a especificidade dos iniciadores mas confere uma maior estabilidade à Taq DNA polimerase o que permite uma melhor ampliação dos produtos de maiores dimensões. Experimentado no segundo RT-PCR [ver figura 29 (b)]. A diminuição do intervalo de emparelhamento dos iniciadores pode ter contrariado este efeito. No entanto, o maior problema deve ter sido o facto da síntese da primeira cadeia de cDNA ter sido realizada com o iniciador a 3' tornando o cDNA inespecífico mais abundante na reacção.

O PCR sobre DNA genómico, por outro lado, demonstra a transgenia dos discos foliares de forma clara. O amplificado corresponde ao tamanho esperado (1582 bp) e está totalmente ausente na planta não transformada. Os iniciadores utilizados ampliam para além do cDNA do GFP o promotor CAMV35S e a terminação Nos 3'-UTR, o que implica que o T-DNA do pCAMBIA 1302 foi integrado no genoma das plantas transformadas. Os discos foliares transformados têm todas as condições para a transcrição e tradução da GFP.

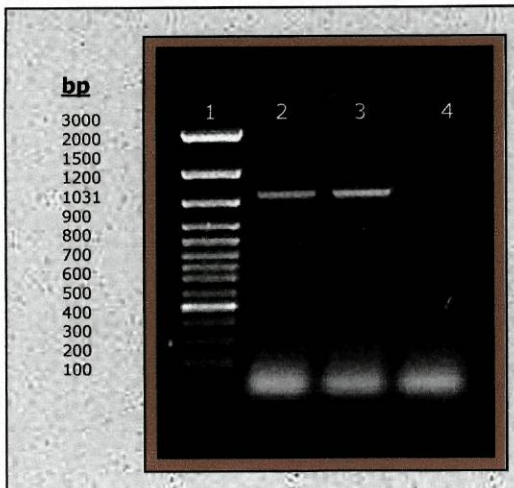


Figura 30 – Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, representando o produto de PCR de DNA genómico de disco foliar transformado com GFP (2 e 3) e não transformado (4) com os iniciadores F35S e RNos (ver *MATERIAL E MÉTODOS*). 1 – Generuler™ 100 bp DNA Ladder da *FERMENTAS* (marcador de pesos moleculares); 2 – produto de PCR DNA genómico extraído de disco foliar transformado incubado em meio líquido; 3 - produto de PCR DNA genómico extraído de disco foliar transformado incubado em meio sólido; 4 - produto de PCR DNA genómico extraído de disco foliar não transformado. Ao lado encontra-se a lista dos tamanhos do marcador de pesos moleculares.

CULTURA E ARMAZENAMENTO DE *Agrobacterium tumefaciens*

O crescimento de agrobactérias em meio YM, YEP e YEP1 (ver *MATERIAL E MÉTODOS)* em meio líquido foi muito lento e pouco eficiente. Frequentemente as culturas não cresceram ou cresceram aglomeradas em um ou dois blocos, exceptuando neste ponto o meio YEP1 onde os aglomerados eram de tamanho reduzido. Em meio YM e YEP sólido as agrobactérias não transformadas cresceram em contínuo em meio suplementado com espectinomicina.

O meio que passou a ser adoptado neste trabalho foi o LB1 (ver *MATERIAL E MÉTODOS)* onde as agrobactérias cresciam, em cerca de 16 horas, em meio líquido formando uma cultura opaca e homogénea. Este meio nutritivo está desde hà muito estabelecido para outras bactérias fornecendo os elementos essenciais ao crescimento bacteriano. A presença de sulfato de magnésio foi documentada como capaz de reduzir a aglomeração de agrobactérias LBA4404 (http://r9corporation.fsnet.co.uk/Methods/agrotransformation.htm). Neste meio, suplementado com o antibiótico adequado, tanto agrobactérias transformadas como não cresceram em colónias isoladas. No entanto, não se conseguiu evitar a formação de pequenos agregados em meio líquido presumivelmente devido a uma agitação deficiente (ver figura 29).



Figura 29 – Aspecto de cultura líquida de agrobactérias transformadas com pCAMBIA 1302 em meio LB1 suplementado com 50 μg de canamicina por mL de meio. A agitação deficiente provoca o crescimento em agregados.

As colónias de agrobactérias transformadas demoraram cerca de 5 dias a surgir em placa com antibiótico canamicina. Para esta situação contribuiu o crescimento lento característico destas bactérias e a necessidade de vedar as placas utilizadas para a recuperação com parafilm. A estufa utilizada tinha incorporado um desumificador que desidratava rapidamente o meio.

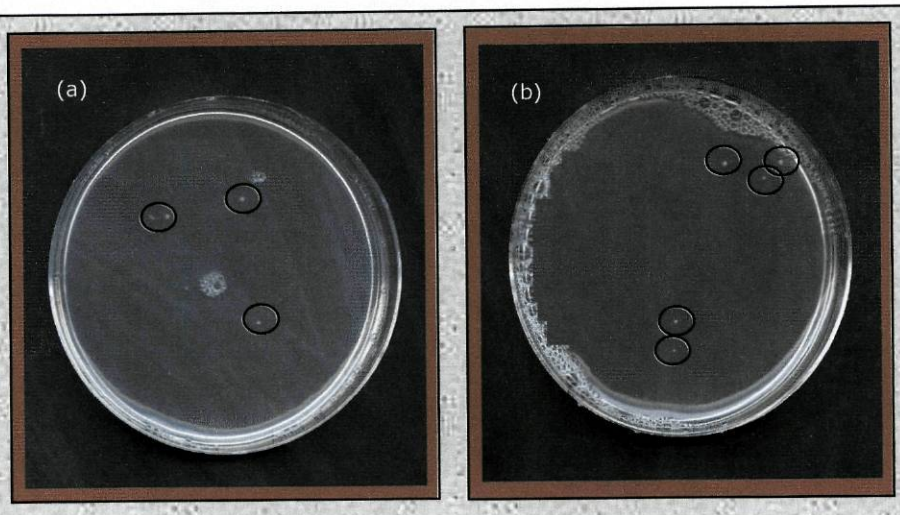


Figura 30 – Colónias isoladas de agrobactérias LBA4404 não transformadas (a) e transformadas com pCAMBIA 1302 (b) em meio LB1 suplementado com 100 μg de espectinomicina (a) e 50 μg de canamicina (b) por mL de meio. As primeiras colónias surgem ao fim de 5 dias. As colónias de agrobactérias estão rodeadas por um círculo preto.

O período extenso de crescimento em meio selectivo levantou a possibilidade de colónias contaminantes. No caso das agrobactérias não transformadas realizou-se um controlo que consistia no crescimento de parte da cultura em placas com canamicina. As agrobactérias não sobreviveram a este tratamento (ver figura 30) o que permitiu afirmar que as colónias observadas na figura (a) eram de agrobactérias viáveis e partir para a transformação.

A confirmação da transformação foi feita através de preparação de plasmídio por lise alcalina de cada colónia isolada que tenha crescido em meio suplementado com canamicina. Esta técnica acoplada a análise de restrição atesta a integridade do vector binário.

TRANSFORMAÇÃO DE *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ELECTROMAX

O método generalizado para a manipulação de genes e respectiva transferência para o genoma de plantas ocorre em duas fases. Primeiro todas as técnicas de clonagem e modificação de DNA são executados em *E. coli*. O plasmídio binário contendo a construção de interesse é transferido directamente para *Agrobacterium* que o passa às plantas.

Para se poder proceder à transformação das agrobactérias foi necessário torná-las competentes previamente. No entanto, estes dois processos devem ser consecutivos devido à facilidade com que as agrobacteria perdem a competência. Não foi possível transformar células competentes armazenadas em glicerol 50/50 (v/v) a -70ºC.

Estes protocolos revelaram-se eficientes originando agrobacteria transformadas com pCAMBIA 1302 capazes de resistir em meio com canamicina. Tiveram ainda as vantagens de serem de fácil execução e pouco oneroso.

O aspecto determinante deste protocolo consistiu no congelamento das agrobactérias em azoto líquido e imediata transferência para um banho a 37ºC. Um choque térmico acentuado favoreceu fortemente a entrada do plasmídio para o interior da célula não inviabilizando a sobrevivência das agrobacteria.

PREPARAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE ALCALINA DE *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ELECTROMAX TRANSFORMADAS COM pCAMBIA 1302

As agrobactérias são bactérias gram negativas com a capacidade de transformar células eucarióticas. No entanto, é necessário dispor de um método que avalie a integridade do vector plasmídico transformado antes da sua transferência para as plantas.

O protocolo utilizado neste trabalho recorreu à lise bacteriana para a libertação do plasmídio do interior das agrobacteria e subsequente purificação deste. Este procedimento apesar de fácil execução produziu preparações de plasmídio com pouco rendimento e bastante contaminadas com proteínas. Daí a necessidade de se ter procedido à extração com fenol/clorofórmio. Outra alternativa foi a transformação de *E. coli* com estas preparações de plasmídio para posterior análise.

Neste trabalho testou-se várias quantidades de DNA obtido a partir de preparações de plasmídio de *E. coli* DH5α na transformação das agracatérias. Com o objectivo de minorar a contaminação e aumentar o rendimento das preparações de plasmídio de agrobactérias acrescentou-se, relativamente à literatura, o tratamento com RNAse A aquando da lise das agrobactérias e experimentaram-se várias velocidades de centrifugação nos passos finais do protocolo.

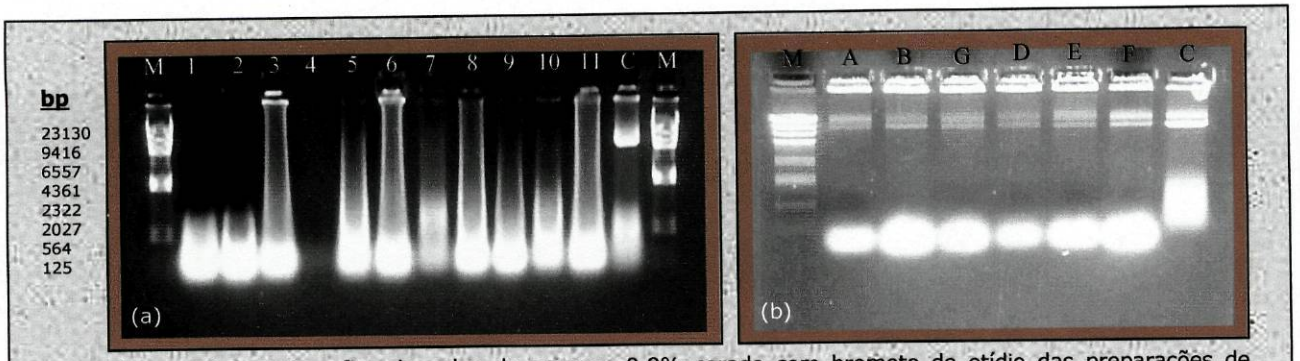


Figura 31 – Fotografias de geles de agarose 0.8% corado com brometo de etídio das preparações de plasmídio de agrobactérias LBA4404 transformadas com pCAMBIA 1302. (a) Preparações de plasmídio em que não se procedeu à extracção do pCAMBIA 1302 por fenol/clorofórmio e lavagem com etanol. Neste caso não se efectuou o tratamento com RNAse A e a velocidade das centifugações nos passos finais do protocolo foram da ordem de 4000 g. As amostras foram fervidas durante 5 min antes de serem carregadas. (b) Preparações plasmídicas obtidas por um procedimento adaptado em que se introduziu as alterações indicadas anteriormente. A velocidade das centifugações nos passos finais do protocolo foram da ordem de 11000 g. M – marcador de pesos moleculares λ/*HindIII*; C – 1 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α. (a) 1 a 2 – preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 20 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α; 3 a 6 - preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 30 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α; 7 a 9 - preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 40 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α; 10 a 11 - preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 50 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α. (b) A a G e F - preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 20 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α; D e E - preparações de plasmídio resultantes de agrobactérias transformadas com 40 μL de preparação de plasmídio de pCAMBIA 1302 de DH5α. Ao lado encontra-se a lista de tamanhos das bandas do marcador.

Como sobressai da figura 31 a diferença de rendimento quando se utilizaram vários volumes de preparação de pCAMBIA 1302 na transformação das agrobactérias foi reduzida. A contaminação com restos celulares no final do protocolo de preparação de plasmídio foi fortemente reduzida quando se elevou a velocidade de centifugação na altura da percipitação dos ácidos nucleicos de 4000 para 11000g. A redução da contaminação de RNA no gel (b) da figura resultou da introdução de RNAse A aquando da lise bacteriana. No entanto, ter-se-ia obtido um melhor resultado aumentando a concentração desta enzima. O rendimento melhorou substancialmente, bem como a pureza das preparações de plasmídio quando se realizou a extração do plasmídio por fenol/clorofórmio. Apesar de no gel (a) da figura 31 não se conseguir observar bandas correspondentes ao pCAMBIA 1302 a transformação de *E. coli* DH5α com preparações de plasmídio obtidas a partir de agrobacteria veio comprovar a validade deste protocolo. Quando se recorreu à análise de restrição com *EcoR* I das

preparações de plasmídio obtidas a partir destas bactérias as bandas resultantes corresponderam ao tamanho esperado para o pCAMBIA 1302 inalterado (ver figura 32).

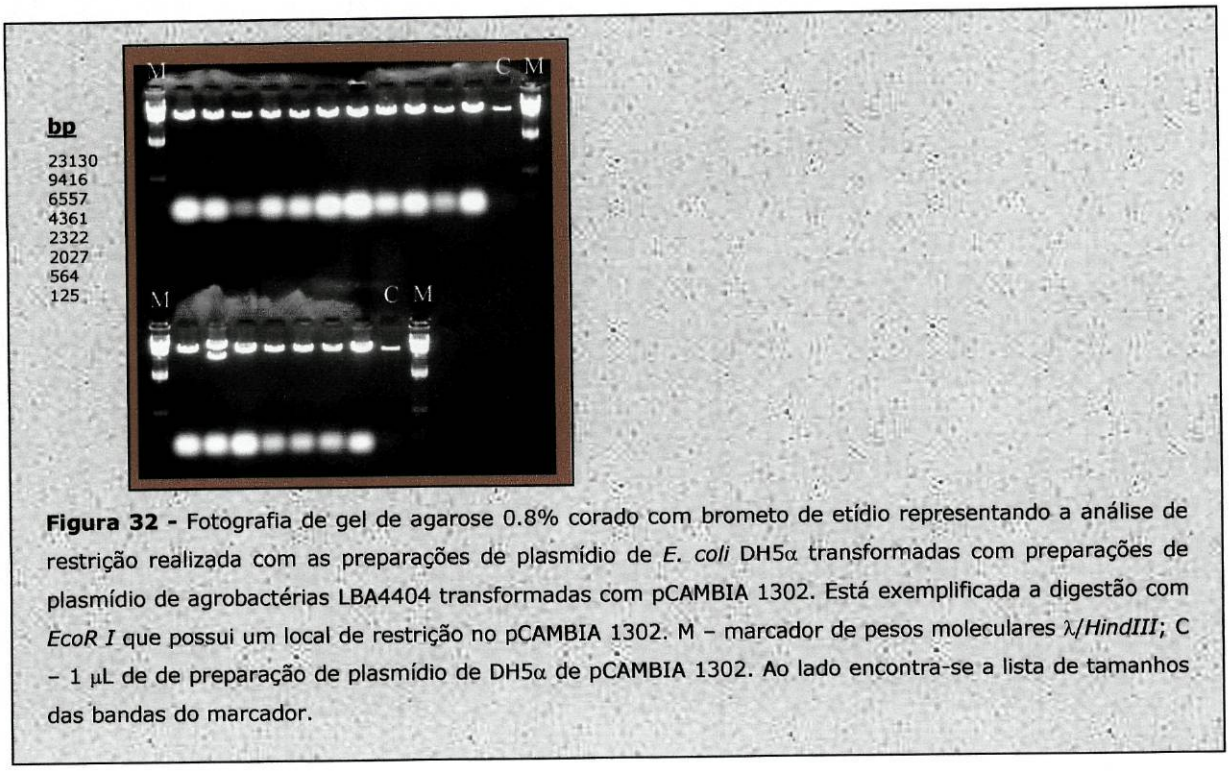


Figura 32 - Fotografia de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio representando a análise de restrição realizada com as preparações de plasmídio de *E. coli* DH5α transformadas com preparações de plasmídio de agrobactérias LBA4404 transformadas com pCAMBIA 1302. Está exemplificada a digestão com *EcoR I* que possui um local de restrição no pCAMBIA 1302. M – marcador de pesos moleculares λ/*HindIII*; C – 1 μL de de preparação de plasmídio de DH5α de pCAMBIA 1302. Ao lado encontra-se a lista de tamanhos das bandas do marcador.

Na figura 33 apresenta-se a análise de restrição utilizando uma enzima com local de restrição duplo no pCAMBIA 1302 em plasmídio proveniente directamente de agrobacteria, purificado por fenol/clorofórmio, e em plasmídio que foi transformado em *E.coli*. Devido ao maior rendimento do último fica patente que a manipulação dos plasmídios deve ser feita em *E. coli*.

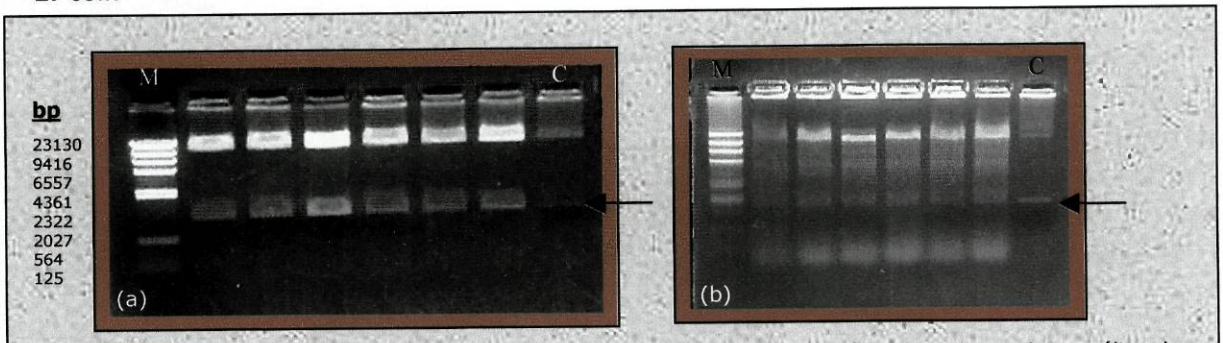


Figura 33 – Fotografias de gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio representando a análise de restrição realizada com (a) preparações de plasmídio de *E. coli* DH5α transformadas com preparações de plasmídio de agrobactérias LBA4404 transformadas com pCAMBIA 1302; (b) preparações de plasmídio de agrobactérias LBA4404 transformadas com pCAMBIA 1302. Está exemplificada a digestão com *Xho I* que possui dois locais de restrição no pCAMBIA 1302, originando um fragmento de 1094 pb (indicado por setas) e outro de 9500 pb. M – marcador de pesos moleculares λ/*HindIII*; C – 1 μL de de preparação de plasmídio de DH5α de pCAMBIA 1302. Ao lado encontra-se a lista de tamanhos das bandas do marcador.

BIBLIOGRAFIA

Alves, A., Quecini, V., Vieira, M. (1999). Plant transformation: advances and perspectives. *Scientia Agricola*. Vol. 56, n. 1.

Beaujean, A., Sangwan, R., Lecardonnel, A., Sangwan-Norreel, B. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 49, pp. 1589 – 1595.

Birnboim, H., Doly, J. (1979).A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. Vol. 24, pp. 1513-23.

Borlido, J., Pereira, S., Ferreira, R., Coelho, N., Duarte, P., Pissarra, J. (2002). Simple and fast in situ hibridization. *Plant Molecular Biology Report*. Vol. 20, pp. 219-229.

Campilho, A. *et al* (1999). A method for extraction of DNA from *Castanea* ssp. and PCR protocol for RAPD reproducibility. *Agronomia Lusitana*. Vol 46, pp. 97 – 99.

Chang, M-M, Culley, D., Choi, J., Hadwiger, L. (2002). *Agrobacterium*- mediated co-transformation of a pea β-1,3- glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science*. Vol. 163, pp. 83-89.

Coelho, N. (2002). Plantas transgénicas: transformação de *Nicotiana tabacum* L. Utilizando GFP; análise da transgenia de *Nicotiana tabacum* L. Transformada com cDNA da cardosina A. Dissertação de mestrado em Biologia do Desenvolvimento e Reprodução Vegetal submetida na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Cubitt, A., Heim, R., Adams, S., Boyd, A., Gross, L., Tsien, R. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS*. Vol. 20, pp. 448-455.

Davis, S., Vierstra, R. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology*. Vol. 36, pp. 521-528.

Dobránszki, J., Mándi, M. (1993). Induction of *in vitro* tuberization by short day period and dark treatment of potato shoots grown on hormone free medium. *Acta Biologica Hungarica*. Vol. 44, pp. 411 – 420.

Fernie, A., Willmitzer, L. (2001). Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology*. Vol. 127, pp. 1459 – 1465.

Golmirzaie, A., Toledo, J. (1997-98). In vitro conservation of potato and sweet potato germplasm. CIP Program Report. International Potato Center, Lima, Peru. pp. 351 – 356.

Harris, P. (1992). The Potato Crop: the scientific basis for improvement. 2º edição. Chapman & Hall.

Haseloff, J., Siemering, K. The uses of GFP in plants. GFP: green fluorescent protein strategies and applications. in Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols. Chalfie, M. and Kain, S. Eds. John Wiley. (1998).

Haseloff, J., Siemering, K., prasher, D., Hodge, S. (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 94, pp. 2122-2127.

Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*. Vol 5, pp. 446 – 451.

Hussey, G., Stacey, N. (1984). Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany.* Vol. 53, pp. 565 – 578.

Levy, D., Seabrook, J., Coleman, S. (1993). Enhancement of tuberization of axillary shoot buds of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars cultured *in vitro*. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 44, pp. 381 – 386.

Li, P. (1985). Potato Physiology. 1º edição. Academic Press.

Lin, j.-J., Ma, J., Garcia-Assad, N., Kuo, J. (1996). Hygromycin B as na efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. *Focus*. Vol. 18,N. 2, pp. 47 – 49.

Liu, T.-H., Loren, S., Hannapel, D. (1995). Transformation of *Solanum brevidens* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. Vol 15, pp. 196 – 199.

Pereira, S. (1998). Isoformas da glutamina sintetase em *Solanum tuberosum L.*. Localização de expressão, caracterização bioquímica e molecular e papel das isoenzimas na eficiência de utilização de azoto em diferentes situações fisiológicas. Tese de doutoramento apresentada na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Roberts, C., Rajagopal, S., Smith, L., Nguyen, T., Yang, W., Nugroho, S., Ravi, K., Cao, M.-L., Vijayachandra, K., Patell, V., Harcourt, R., Dransfield, L., Desamero, N., Slamet, I., Keese, P., Kilian, A., Jefferson, R. (1998). A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. *PCAMBIA Vector release manual version 3.05.*

Sidorov, V., Kasten, D., Pang, S-Z., Hajdukiewicz, T., Staub, J., Nehra, N. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *The Plant Journal.* Vol 19, pp. 209-216.

Siemering, K., Golbik, R., Sever, R., Haseloff, J. (1996). Mutations that supress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*. Vol 6, pp. 1653-1663.

Silva, J., Otoni, W., Martinez, C., Dias, L., Silva, M. (2001). Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as affected by salinity. *Scientia Horticulturae*. Vol. 89, pp. 91–101.

Tisserat, B. (1987). Plant cell culture. A pratical approach. Ed. R. A. Dixon. IRL Press.

Xu, X., Vreugdenhil, D., van Lammeren, A. (1998). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 49, pp. 573-582.

Wenzler, H., Mignery, G., May, G., Park, W. (1989). A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. *Plant Science*. Vol. 63, pp. 79 – 85.

Zupan, J., Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Vol. 107, pp. 1041 – 1047.

http://www.bioprotocols.com/protocolstools

http://r9corporation.fsnet.co.uk/Methods/agrotransformation.htm

CAPÍTULO 3

Conclusão

PERSPECTIVAS FUTURAS

A transformação de plantas é um instrumento essencial à investigação molecular e bioquímica em plantas. Contudo, as ferramentas disponíveis nos sectores comerciais ou aquelas desenvolvidas por institutos públicos são ainda muito escassas. Acresce ainda a pouca flexibilidade para manipulação que estes instrumentos apresentam. Assim, urge desenvolver novas vias que facilitem os trabalhos em manipulação genética de plantas.

Alguns vírus que infectam plantas podem facilmente ser manipulados a nível biotecnológico, particularmente o "Pepper Ringspot Virus", usado neste trabalho. Para que este vírus possa constituir uma via de manipulação genética é necessário confirmar a actividade do promotor como definido neste trabalho, o que poderá ser conseguido após inserção da GFP a jusante desse promotor, com posterior transformação de plantas. Esta estratégia também permitirá estudar a importância dos motivos do promotor.

Devido à provável toxicidade da GFP quando expressa no citoplasma será necessário confirmar esta situação, recorrendo à transformação de batateira com pCAMBIA 1302 a que tenha sido deletado o cDNA de GFP. Desta forma, poderemos afastar a hipótese do fraco desenvolvimento das plantas devido à presença de antibióticos no meio. Neste sentido, foram iniciados trabalhos e presentemente já foi concluída a obtenção do plasmídio pCAMBIA 1302 com GFP deletada. Este vector, além de funcionar como controlo para transformações, permitirá a fácil substituição por cDNAs heterólogos com intuito de silenciar ou sobre-expressar proteínas em qualquer sistema vegetal, recorrendo à transformação mediada por agrobacteria.

Uma outra forma de ultrapassar e mesmo confirmar os resultados obtidos neste trabalho, seria recorrer à transformação de plantas com mutantes de GFP menos deletérios. Uma vez apurados os mutantes de GFP que viabilizam uma boa regeneração de plantas poder-se-ão utilizar para a transformação com proteínas de fusão ou mesmo com construções génicas que incluam motivos genéticos específicos para estudo, por exemplo, do trânsito celular.

No seu conjunto, o "Pepper Ringspot Virus" e um mutante não deletério de GFP poderão ser utilizados como via de transformação de plantas. O vírus poderá permitir níveis elevados de produção de proteína heteróloga devido à elevada multiplicação do vírus e evitando procedimentos de transformação morosos.

CONCLUSÃO

A expressão de proteínas heterólogas em plantas é um instrumento essencial no estudo dos processos genéticos e bioquímicos das plantas. O conhecimento destes processos na batateira são de especial importância visto ser uma cultura fortemente utilizada, muitas vezes em condições particulares de stresse. A produtividade da cultura em cada situação específica poderia melhorar com a manipulação genética que obviasse os efeitos prejudiciais. Nomeadamente, as plantas transgénicas podem facultar informações para a investigação tendo também uma aplicação comercial. A qualidade nutricional da dieta das populações ou a defesa contra doenças específicas de cada comunidade poderia ser feita através de uma alimentação com plantas transgénicas.

Neste trabalho, começou-se por determinar uma possível estrutura do promotor da proteína da cápsula com vista à produção de construções quiméricas com proteínas heterólogas e subsequente transformação de plantas via vírus PepRSV. Justificou-se a importância da localização da proteína heteróloga no RNA2 do vírus a jusante do gene da proteína da cápsula. Este trabalho viabiliza a futura clonagem de um gene repórter, como a GFP, no RNA2 com a inserção do promotor da proteína da cápsula num plasmídio de fácil manipulação biotecnológica e de um local de restrição múltipla no interior do RNA2. Esta estratégia permitirá estudar a eficiência do promotor definido e conduzir à futura clonagem de outros cDNAs heterólogos. A inexistência de clones de RNA 1 infeccioso impediu testar as construções *in vivo*.

O desenvolvimento de plantas transgénicas por via de agrobactérias implicou a exploração dos procedimentos de transformação, tanto de agrobactérias como de batateira, e das técnicas de regeneração de plantas *in vitro*. Os protocolos utilizados neste trabalho são de fácil manipulação e apresentam resultados viáveis. Por outro lado, a regeneração de plantas *in vitro* depois da transformação dos explantes revelou-se mais problemática. Veio confirmar-se que a GFP citosólica cujo gene está incluído no pCAMBIA 1302 que permitiu a verificação do sucesso da transformação sem o recurso a técnicas laboratoriais complexas apresenta toxicidade visto as plantas terem fraco crescimento acabando por senescer. Assim, esta GFP não deverá ser utilizada como gene repórter no vector de transformação que possa vir a ser desenvolvido com o promotor do PepRSV descrito neste trabalho.

Foram testados vários meios baseados na literatura da especialidade. Estão aqui documentados aqueles com que se obtiveram melhores resultados para cada situação. Quando se trabalhou com discos foliares observou-se que a regeneração e sobrevivência das plântulas após a transformação era mais efectiva em meio líquido. Houve igualmente a necessidade de reduzir as concentrações dos antibióticos utilizados na selecção de plantas transgénicas. A transgenia foi confirmada por técnicas de biologia molecular.

Por outro lado, iniciou-se a implementação de um sistema de culturas *in vitro,* quer de plantas quer de tubérculos de batateira, em condições altamente controladas. Evita-se também a falta de batateiras fora da época da sua colheita.