

# Transformação da planta *Medicago truncatula* para aumentar a tolerância ao stress hídrico

Carvalho, Cláudia nº 15740 Curso de Biologia  
Reis, Daniel nº 15837 Curso de Biologia

Ano lectivo 2003/2004

## Introdução:

A *M. truncatula* é uma espécie de luzerna – uma erva forrageira. É considerada uma planta modelo das leguminosas<sup>(1)</sup>. No ITQB/IBET, introduziram-se com sucesso dois genes que conferem tolerância à secura: o *Adc*, que codifica a arginina descarboxilase, uma enzima que participa na redução da perda de clorofila durante o stress hídrico<sup>(2)</sup>; e o *Dsp22*, que codifica a “stress drought protein 22”<sup>(3)</sup>. Os dois genes encontram-se inseridos em plantas diferentes e são regulados por um promotor viral constitutivo (o  $P_{35S}$ )<sup>(3)</sup>. A avaliação do fenótipo de tolerância à secura só será feita a partir do segundo semestre de 2004.

O método de transformação que se encontra desenvolvido para *M. truncatula* utiliza a capacidade natural da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* para transferir parte do seu DNA plasmídico e integrá-lo num cromossoma da célula vegetal<sup>(4)</sup>. Usa-se o plasmídeo modificado pGreenII e dota-se com o gene de resistência à canamicina ( $Kan^R$ ), capaz de ser expresso em plantas<sup>(5)</sup>. De facto, para *M. truncatula*, a canamicina parece ser o único antibiótico que não perturba a regeneração vegetal a partir de células transformadas.

As células transformadas podem regenerar uma nova planta, através da sua submissão a tratamentos fisiológicos adequados<sup>(5)</sup>.



Fig 1: *Medicago truncatula* adulta

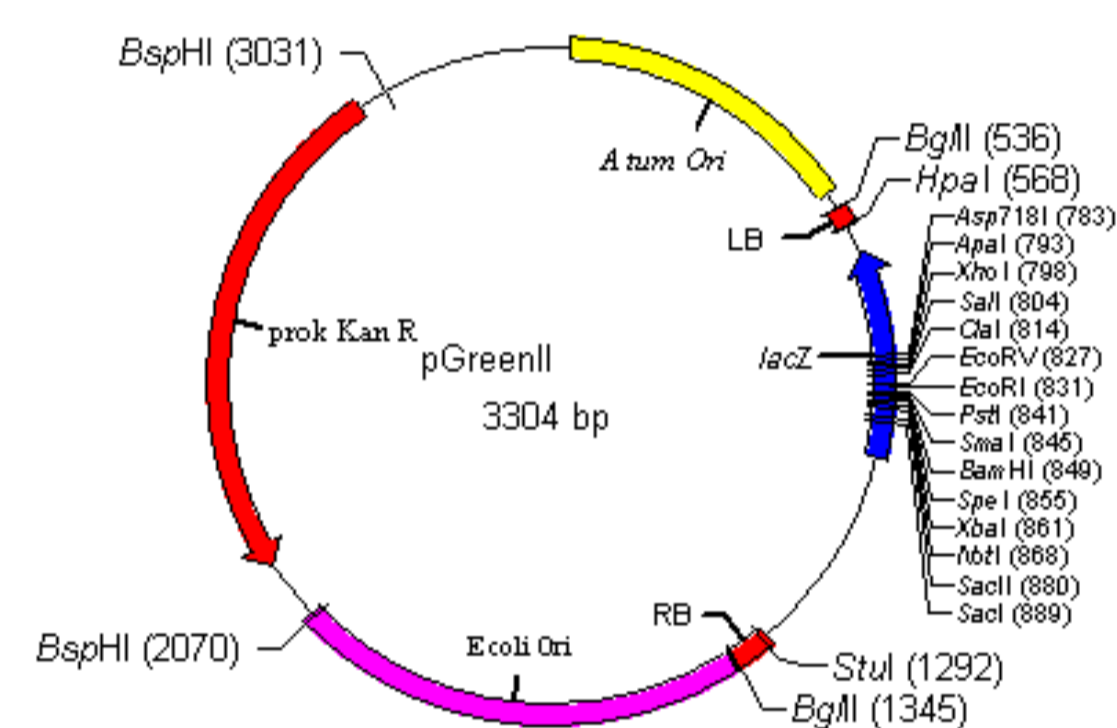


Fig 2: Representação do pGreenII

## Objectivo do projecto:

Obter uma *M. truncatula* transformada com três genes associados à tolerância à secura, cuja expressão ocorra apenas em períodos de secura do solo. Simultaneamente, a expressão será maximizada pela presença de promotores fortes. O vector usado continuará a ser plasmídeo pGreenII, transportado por *A. tumefaciens*.

Parte-se do pressuposto que cada um dos três genes contribui substancialmente para a tolerância à secura em *M. truncatula*.

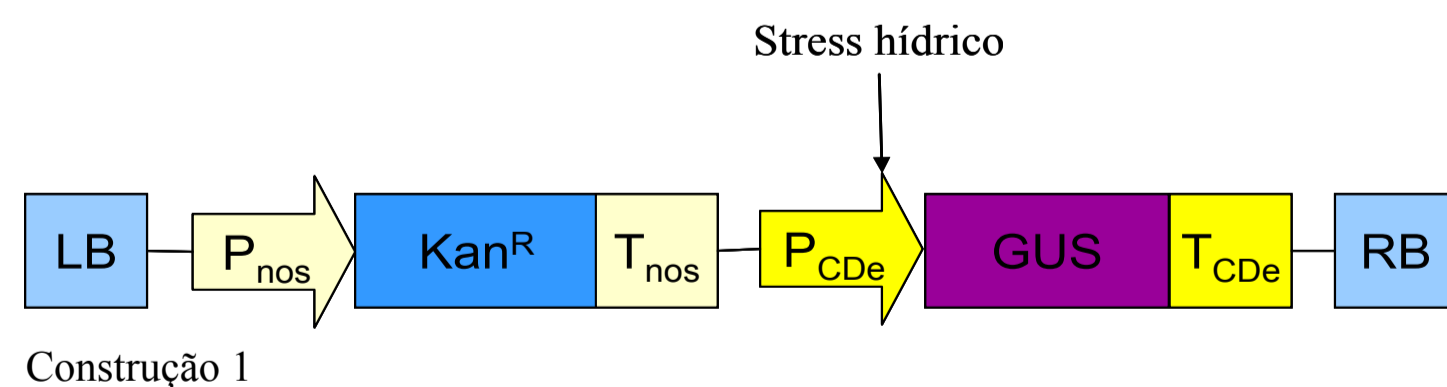
## Metodologia

### A. Transformação com Mn-Sod

Transformar a *M. truncatula* nativa com um terceiro gene de tolerância à secura: o Mn-Sod, que codifica a Mn-superóxido dismutase, uma enzima importante na degradação de radicais livres que se acumulam durante o stress hídrico<sup>(2)</sup>. Tal consegue-se com a mesma metodologia que foi usada para as transformações com os genes *Adc* e *Dsp22*<sup>(3)</sup>. Apurar o fenótipo de tolerância à secura, com metodologia adequada.

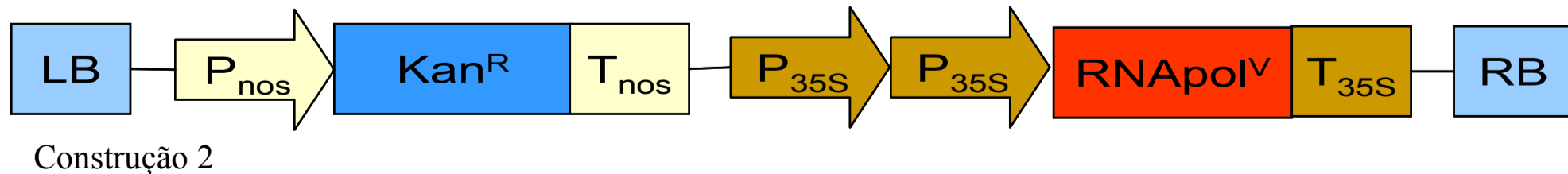
### B. Estudo da acção de um promotor indutível pelo stress hídrico—o $P_{CDeT24-45}$ <sup>(6)</sup>

Introduzir o gene repórter GUS (que codifica a  $\beta$ -glucuronidase) entre o promotor  $P_{CDe}$  e a terminação  $T_{CDe}$  e transformar células de *M. truncatula* nativas com a construção 1. A  $\beta$ -glucuronidase só será expressa quando a planta estiver sujeita à secura e é indetectável pela cor azul que dá a um meio com X-Glc<sup>(4)</sup>.



### C. Estudo da expressão de uma RNA polimerase viral vegetal

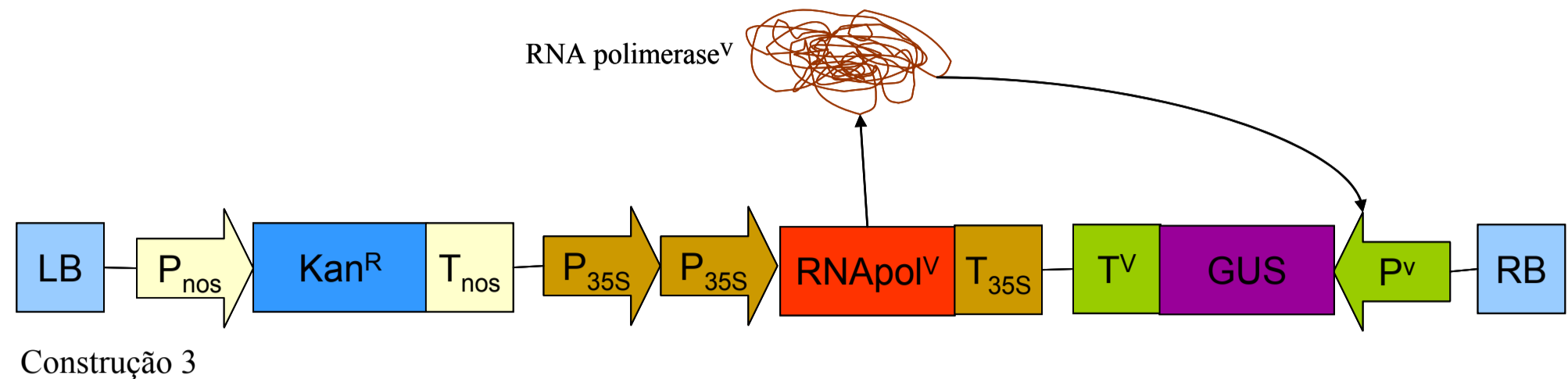
Esta hipotética RNA polimerase reconhece apenas um promotor viral forte e constitutivo  $P^V$ , promotor esse que não é reconhecido pelas RNA polimerases celulares. Colocar o gene  $RNApol^V$  a jusante do promotor constitutivo  $P_{35S}$  e transformar células de planta nativa com a construção 2. A produção da enzima será sondada através de um Northern blotting<sup>(7)</sup>.



Construção 2

### D. Estudo da transcrição pela RNA polimerase viral

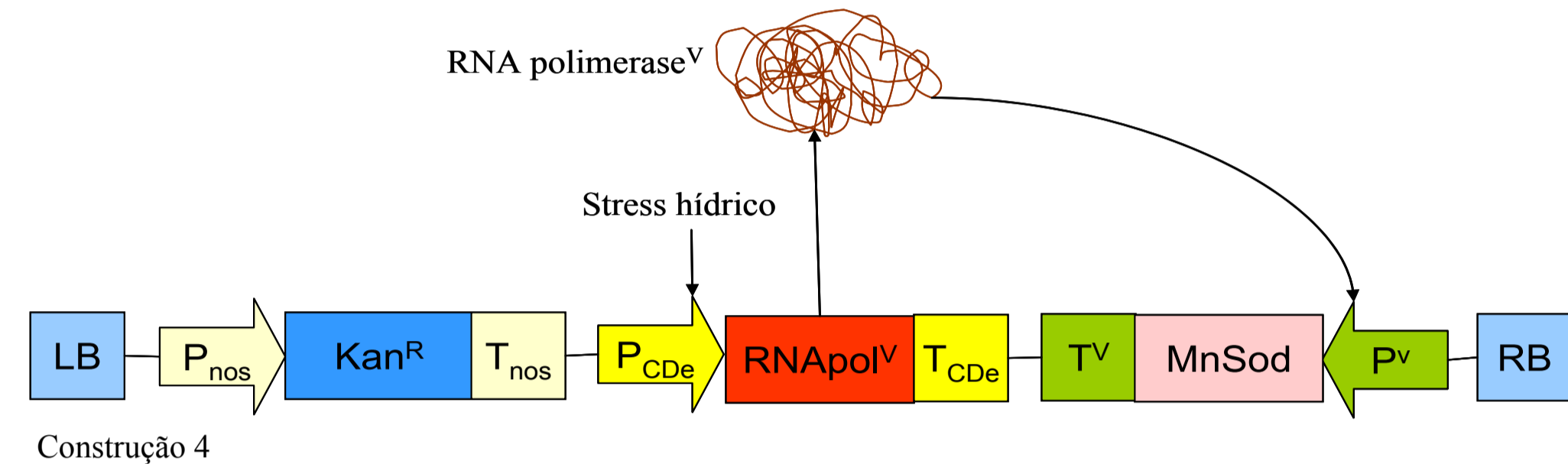
Colocar o gene repórter GUS a jusante do promotor viral  $P^V$ , fundir esta construção com a cassette  $P_{35S}P_{35S}-RNApol^V-T_{35S}$  e transformar as plantas nativas com a construção 3. A RNA polimerase V sintetizará o mRNA de GUS e a expressão será revelada pelo X-Glc.



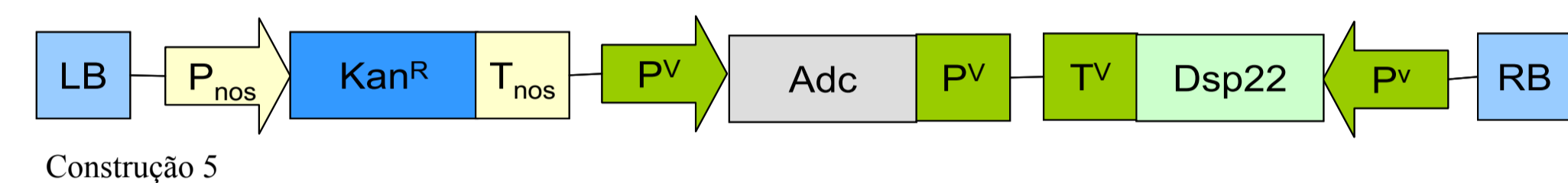
Construção 3

### E. Construções finais

Colocar os genes de tolerância ao stress hídrico a jusante de promotores  $P^V$  e introduzir o gene  $RNApol^V$  a jusante do promotor  $P_{CDe}$ . Transformar umas *M. truncatula* nativas com a construção 4 e outras com a construção 5. Confirmar a presença dos genes *Adc* e *Dsp22* através de Southern blotting<sup>(3)</sup> e verificar a transcrição dos genes  $RNApol^V$  e Mn-Sod, pela análise dos respectivos cDNAs através do Southern blotting.



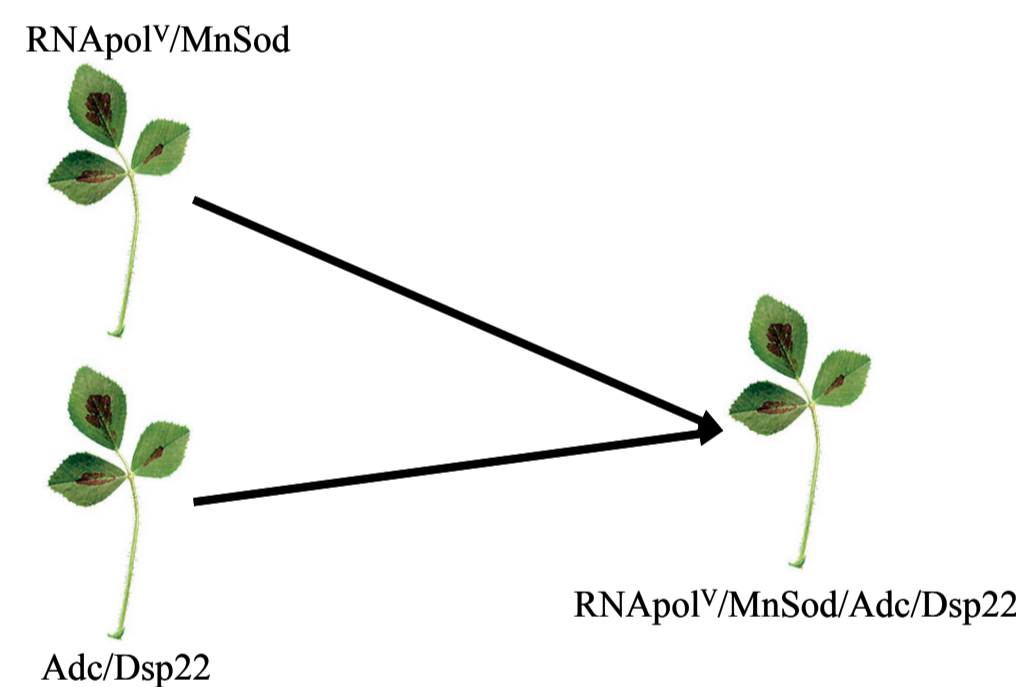
Construção 4



Construção 5

### F. Cruzamento e estudo da transcrição completa

Seleccionar os indivíduos que tenham integradas as construções 4 e 5 em cromossomas diferentes não homólogos. Cruzar as *M. truncatula* portadoras da construção 4 com as portadoras da construção 5 e identificar as plantas que contêm simultaneamente as duas construções. A presença e localização das construções é detectada por sondas moleculares<sup>(7)</sup>. Verificar a transcrição dos quatro genes pela electroforese dos respectivos cDNAs<sup>(8)</sup>.



### G. Obtenção de linhas puras e estudo do fenótipo

Cruzar as plantas portadoras das duas construções e escolher as duplas homocigóticas, através da hibridação por sondas moleculares. Averiguar o seu grau de tolerância à secura, com metodologia adequada.

### Cronograma:

As etapas A, B e C podem ser feitas quase simultaneamente, com um desfazamento de 2 semanas. As etapas seguintes dependem do sucesso da anterior.

Etapas	Duração
A, B e C	13 meses
D	6 meses
E	10 meses
F	6 meses
G	9 meses
Total	3 anos e 9 meses

### Orçamento:

Fonte do custo	Custo (€)
Mão-se-obra (1 licenciado e 1 doutorado)	100 000
Propina pelo uso das instalações e aparelhos do ITQB	25 000
Reagentes e plasmídeos	5 000
Total	330 000

### Agradecimentos:

Os autores agradecem o fornecimento de material bibliográfico por P. Fevereiro (ITQB/FCUL) e a disponibilidade para tirar dúvidas de P. Fevereiro, C. Sinogas (Univ. Évora), A. Costa (Univ. Évora) e P. Vale (Univ. Évora/IGC).

## Bibliografia:

- Cook DR (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 301–304
- Datta SK (2002) Recent developments in transgenics for abiotic stress tolerance in rice. *Jircas Work. Rep.* 43–53.
- Araújo SS, Duque ASRL, Santos DMMF & Fevereiro MPS (2003) An efficient transformation to regenerate a high number of transgenic plants using a new embryogenic line of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 78: 123–131.
- Lea PJ & Leegood RC (1999) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 1<sup>st</sup> ed– John Wiley & Sons. 242–343
- Hellens P, Edwards EA, Leyland NR, Bean S & Mullineaux PM (2000) pGreen, a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42: 819–832
- Mundree SG, Baker B, Mowla S, Peters S, Marais S, Willingen CV *et al* (2002) Physiological and molecular insights into drought tolerance. *Afr. J. Biotech.* 1(2): 28–38.
- Glick BR & Pasternack JJ (2003) *Molecular biotechnology—principles and applications of recombinant DNA*. 3<sup>rd</sup> ed–ASM Press. Washington. pp. 760
- Santos DMMF, Araújo SS, Duque ASRL & Fevereiro MPS (2003) Reverse transcription-PCR assay to verify gene integrity within plasmid constructs for plant transformation. *Plant Cell Tiss. Org.* 74: 293–296

