



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR
DISCIPLINA: BIOLOGIA MOLECULAR - BIQ 043 - ANO: 2007/2º

PROJETO

(Aproveitamento de Solos Contaminados por Metais Pesados a Partir de Eucaliptos
Transgênicos)

Elaborado por:

Fernando de Moura Resende 2006025354

Christiane Freitas A. Mendes 2006026040

Hani Rocha El Bizri 2006025427

Pedro Oliveira de Sena Batista 2006026520

Tarcísio Brasil Caires 2006025800

Professor José Miguel Ortega - Turma R

Ciências Biológicas (Diurno) – 3º Período

Belo Horizonte, dezembro de 2007

INTRODUÇÃO

Eucalipto é a designação vulgar para espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, da família botânica Mirtaceae e de grande maioria originária da Austrália. Possui grande adaptabilidade a diferentes tipos climáticos e, devido a esse fato, tem sido utilizado ao longo da história como fonte para vários produtos de importância econômica no mundo. Na América do Sul, as espécies importadas de maior aplicabilidade são *E. grandis* e *E. urophylla*, responsáveis pelas vastas plantações com finalidade de extração da madeira para produção de papel, móveis e carvão vegetal, e de suas folhas para fabricação de produtos que envolvam aromatização, devido a presença de óleos essenciais.

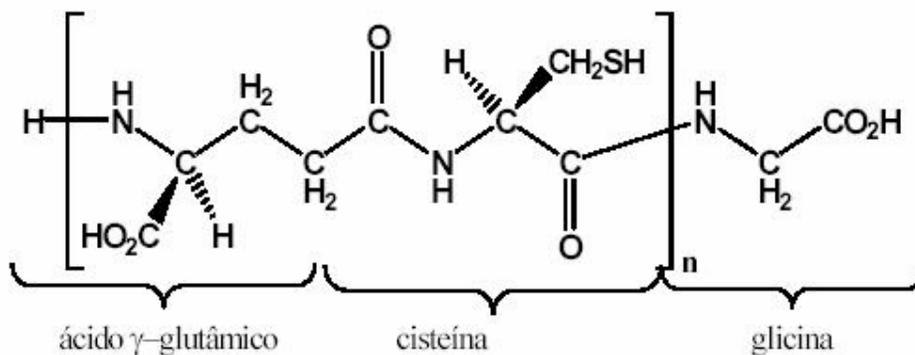
No Brasil, as plantações de eucalipto ocupam atualmente grandes regiões agrícolas e nativas. Estão distribuídos em 530 milhões de hectares de florestas nativas, 43,5 milhões em conservação federal e 4,8 milhões de hectares com plantio de um híbrido de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*. Essas plantações movimentam mais de 20 bilhões do PIB brasileiro, gerando mais de 2 milhões de empregos diretamente.

Apesar da contribuição das plantações florestais estarem aumentando em todos os segmentos em relação a florestas nativas, acredita-se que haverá crescimento da demanda ao longo dos anos e, conseqüentemente, um aumento do plantio para extração. Hoje, existe uma demanda de 200 mil novos hectares a cada ano dedicados ao plantio de eucalipto. Essa demanda é crescente e estima-se que dentro de poucos anos será de 630 mil hectares por ano. Devido à necessidade industrial e a constante preocupação com o meio ambiente, trabalhos envolvendo o estabelecimento de melhoramento genético em eucaliptos, apesar de recentes, estão em crescimento.

O melhoramento genético, em sua essência, pode ser considerado fato usual na evolução das sociedades humanas, utilizando-se técnicas antigas de cruzamentos e hibridizações para melhoria da qualidade do animal ou vegetal. Hoje em dia, o melhoramento genético comumente determina a incorporação por um organismo do material gênico proveniente de outro ser através de técnicas laboratoriais. Desse modo, são produzidas linhagens com alguma característica nova que lhes confere propriedades envolvendo, principalmente, aumento da produtividade, produção de novas moléculas e resistência a diferentes tipos de patógenos e substâncias (Allard et al. 1971). O processo de transformação genética tem sido aprimorado desde a década de 80, quando Stachel e Zambryski relataram o uso de *Agrobacterium tumefaciens*, modificada geneticamente para introdução de genes exógenos em plantas. Em vegetais, são vários os estudos quanto à resistência a metais pesados e a procura por um melhoramento a fim de se obter espécimes capazes de suportar ambientes altamente contaminados por tais substâncias.

Porém, tais estudos sobre as concentrações e formas dos metais pesados em solos e seus efeitos no ecossistema são ainda pouco enfatizados, principalmente em condições tropicais, apesar de a poluição do solo ser amplamente constatada (Filho et al. 1999). Sabe-se que todas as espécies de vegetais, assim como qualquer outro ser vivo, necessitam de certa quantidade de metais pesados específicos no organismo para a realização de suas funções vitais. Porém, altas concentrações dessas substâncias, como também aquelas não úteis para o metabolismo, são altamente tóxicas e prejudiciais, podendo causar sérios problemas no âmbito de matas naturais como em plantações. Muitas áreas têm sido contaminadas e tornadas relativamente desabitadas pelos resíduos industriais altamente concentrados com metais pesados.

Apesar desse fato, muitas plantas possuem aparato próprio que lhes confere certa resistência a esse tipo de substância. Algo comum e eficiente é a produção de fitoquelatinas. A síntese de fitoquelatinas é responsável por mediar a resistência a metais pesados em plantas, fungos e minhocas. É recente a descoberta de que as fitoquelatinas não estão presentes apenas nas raízes dos vegetais, mas também em seus galhos e folhas. Isso se deve ao fato dessa substância ter responsabilidade de transportar os metais pesados acumulados nas ramificações das raízes para outros órgãos da planta e depositá-los em vacúolos intracelulares, sendo considerada molécula de transporte de metais pesados a longa distância e de desintoxicação (Gong et al. 2003). A fitoquelatina se liga aos metais pesados através de grupos tiols. Segue a seguir a estrutura da molécula:



Quanto à espécie de eucalipto *Eucalyptus urophylla*, objeto de nosso estudo, pouco se sabe sobre a produção de fitoquelatinas ou algum método específico de resistência a metais pesados, sendo que a planta sofre diversos danos quando exposta a esses elementos. O cobre (Cu), por exemplo, mesmo tendo essencial importância nas funções de síntese de proteínas e no metabolismo de carboidratos, quando presente em grande quantidade no solo, causa manchas aquosas foliares, clorose e necrose internerval, além do escurecimento das raízes e inibição do crescimento na espécie vegetal citada (Soares et al. 2000). Já quando em solo com cádmio (Cd), a planta apresenta morte das gemas apicais e acentuada queda de folhas.

Portanto, é fato certo que os metais pesados em altas concentrações são fonte de grandes prejuízos para o meio ambiente e para a confecção de produtos que tem como base a proveniência do plantio de espécies vegetais.

OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de exemplares transgênicos de eucaliptos (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) que superexpressam fitoquelatinas visando o aproveitamento de solos contaminados por metais pesados e simultânea recuperação da área.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar o RNAm responsável pela produção de fitoquelatina em *Arabidopsis* e produzir o respectivo cDNA
- Realizar a incorporação do cDNA de interesse ao plasmídeo de *Agrobacterium tumefaciens*
- Infectar fragmentos foliares de eucalipto a partir de T-DNA de *A. tumefaciens*
- Verificar e selecionar as plantas transgênicas
- Cultivar as plantas transformadas em solos contaminados com metais pesados
- Avaliar, após o cultivo, a concentração de metais pesados presente no solo dos vasos com os vegetais transgênicos e com os vegetais controles e comparar os resultados

METODOLOGIA

Seleção e cultivo das plantas para estudo

Serão realizadas coletas de 250-300 sementes de eucalipto e selecionadas as maiores. Tais sementes serão cultivadas *in vitro* durante 30-40 dias para germinação. Os melhores plantéis serão selecionados com base na viabilidade e vigor de germinação. Desse modo, as 50 melhores mudas serão cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas e hormônios, nomeado meio M (tabela 1). Excisaremos os nós do caule contendo um par de folhas para que ocorra o desenvolvimento das gemas axilares. Serão realizadas diversas culturas subseqüentes a fim de obter um estoque de clones.

Comparação

A partir das plantas obtidas com os tratamentos e controle será realizada uma comparação para averiguar se houve atividade da planta com relação a retirada de metal pesado do solo.

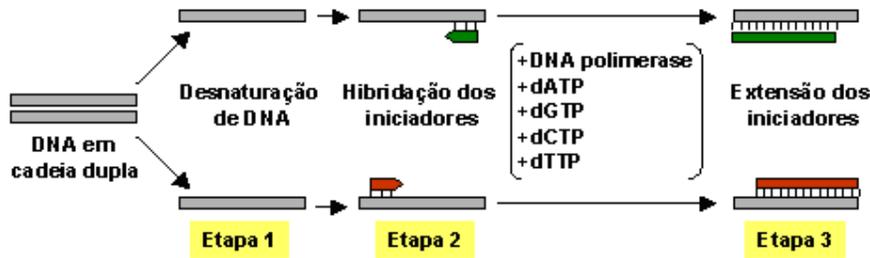
Essa comparação levará em conta principalmente o crescimento das plantas, o teor de metal pesado no solo (através de análises biogeoquímicas) e observação de possíveis efeitos do metal pesado nas características da planta.

Obtenção do cDNA a partir do RNAm de *Arabidopsis*.

O cDNA que corresponde ao gene da fitoquelatina que será utilizado para fazer o transgênico, será obtido através do RNAm da planta do gênero *Arabidopsis*, a qual sintetiza a proteína naturalmente. *Arabidopsis* é um gênero bastante estudado e já possui o seu genoma totalmente seqüenciado. A partir dele, o RNAm que codifica a fitoquelatina já é conhecido e será utilizado para gerar o cDNA. Inicialmente iremos purificar os RNA mensageiros, utilizando o Kit RNA Oligotex. A partir de então iremos gerar o cDNA a partir do RNAm da fitoquelatina. O processo envolve a enzima transcriptase reversa.

Clonagem do cDNA pelo método PCR

A técnica de PCR (*Polimerase chain reaction* - reação em cadeia pela Polimerase) baseia-se no processo de replicação de cDNA que ocorre *in vivo*. Durante o PCR serão usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de cDNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples e geralmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos, obtidos por síntese química. Junto aos primers, será inserida uma seqüência de oligonucleotídeos que será reconhecida por uma enzima de restrição, a qual irá cortar o fragmento de interesse para que o mesmo seja inserido no vetor. Junto dessa seqüência oligonucleotídica, será incorporada outra sequência de bases nitrogenadas que permite uma melhor atuação da enzima de restrição ao seu sítio alvo. Para amplificar a região de interesse que expressa a fitoquelatina, são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de cDNA a amplificar, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA Polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar:



Para realizar o PCR são necessárias pequenas quantidades do cDNA alvo, um tampão salino contendo a Polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, os quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o co-fator Mg^{2+} . Esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem em:

- Desnaturação do DNA alvo pelo calor (tipicamente 1 minuto a 94-96°C), de modo a separar as duas cadeias
- Associação dos iniciadores por ligações de hidrogênio ao DNA alvo em cadeia simples. Para permitir essa associação, a mistura de reação é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da % GC da seqüência a amplificar)
- Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA Polimerase (tipicamente 1 minuto a 72°C)

O processo envolvendo estes três passos, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de cDNA pré-existente.

Obtenção das linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*

As linhagens de *Agrobacterium tumefaciens*, as quais já possuem os genes uidA que codificará a β -glucuronidase e também o gene nptII o qual confere resistência ao antibiótico canamicina, serão adquiridas através de doação. Por ser uma bactéria muito utilizada em estudos com transgênicos, linhagens já transformadas são acessíveis e serão utilizadas para a realização deste projeto. O gene uidA da β -glucuronidase será importante como um marcador, o qual permitirá a diferenciação de plantas transgênicas daquelas que não expressarão a fitoquelatina. O gene nptII dará resistência às linhagens bacterianas geneticamente modificadas, de forma que será possível realizar a seleção das mesmas.

As linhagens bacterianas receberão ainda o cDNA que codifica a fitoquelatina.

Inserção do cDNA ao vetor plasmidial

A mesma enzima de restrição utilizada no método do PCR, agora será responsável por clivar a seqüência de cDNA e obtida e inseri-la no vetor plasmidial de *Agrobacterium tumefaciens* em construção.

Obtenção do promotor

A utilização do promotor para geração do vetor transgênico será realizada nos mesmos moldes daqueles descritos no trabalho de C. A. Labate o qual foi responsável pela produção do primeiro eucalipto transgênico utilizando também, *Agrobacterium tumefaciens*. (Production of transgenic *Eucalyptus grandis* \times *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system).

Inserção do epítipo HA ao vetor plasmidial

A inserção do epítipo HA (hemaglutinina), à extremidade N terminal ou C terminal do fragmento de cDNA que estará contido no vetor, é de extrema importância. Este epítipo sintetiza a proteína hemaglutinina que será identificada pela reação com um anticorpo específico (Anti-HA). Dessa forma, poderá ser quantificada a expressão da fitoquelatina nas plantas transgênicas.

Seleção e cultivo das plantas para estudo

Serão realizadas coletas de 250-300 sementes de eucalipto e selecionadas as maiores. Tais sementes serão cultivadas *in vitro* durante 30-40 dias para germinação. Os melhores plantéis serão selecionados com base na viabilidade e vigor de germinação. Desse modo, as 50 melhores mudas serão cultivadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas e hormônios, nomeado meio M (tabela 1). Excisaremos os nós do caule contendo um par de folhas para que ocorra o desenvolvimento das gemas axilares. Serão realizadas diversas culturas subsequentes a fim de obter um estoque de clones.

Procedimento para regeneração.

Dos clones obtidos serão retiradas as folhas (5mm de comprimento), sem os pecíolos, e transferidas para o meio de reativação celular (meio BIP, Tabela 1), por 5 dias. Em seguida, o material será transferido para o meio indutor da germinação (meio BIT, Tabela 1) e permanecerá por 5 dias no escuro seguido de 14 dias em baixa luminosidade, 16 horas de foto período e com subcultura a cada 5 dias. Após esse período, serão transferidos para o meio de desenvolvimento de ramos (meio SDM, Tabela 1) por 60 dias, com subcultura a cada 14 dias.

Transformação Genética

Aproximadamente 200 folhas serão excisadas das mudas obtidas cortadas transversalmente em 2 pedaços e cultivadas durante 2 dias no meio de reativação celular (meio BIP, Tabela 1). A transformação genética será realizada utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Uma alíquota de suspensão bacteriana será adicionada à cultura líquida (meio C, Tabela 1). Neste meio serão emersos os explantes foliares e em seguida serão transferidos e incubados, por 5 dias, em meio sólido (meio A2, tabela 1), o qual também apresentará uma alíquota de suspensão bacteriana.

Seleção de transformantes

Para a seleção dos exemplares que sofreram a transformação, os tecidos foliares serão cultivados em meio de regeneração (meio BIP, Tabela 1) contendo os antibióticos canamicina e augmentina. Canamicina será utilizada como um agente seletivo dos explantes foliares transformados. Por outro lado, a finalidade da cefotaxima é a eliminação das *A. tumefaciens*. Os brotos resistentes a canamicina serão transferidos para o meio SDM (Tabela 1) até formarem ramos. Ramos individuais serão transferidos para o meio E (Tabela 1) suplementado com canamicina, para continuar o desenvolvimento. Os ramos maiores serão cultivados para o desenvolvimento das raízes.

Tabela 1 – Composição dos meios utilizados na transformação e regeneração de eucaliptos

Constituents	Bud induction				Shoot development		
	BIP	C	A2	BIT	SDM	M	E
Inorganic substances (mg l ⁻¹)							
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	220	440	441.9	441.9	440	440
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	-	-	0.025	0.025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.25	0.25	0.025	0.025
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85	27.85
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
K ₂ SO ₄	990	-	-	990	990	-	-
KCl	1401	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	170	85	170	170	170	170	170
KI	0.83	0.83	0.83	-	-	0.83	0.83
KNO ₃	-	950	1900	-	-	1900	1900
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	185	370	370	370	370	370
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9	16.9
Na ₂ EDTA	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25	37.25
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
NH ₄ NO ₃	2344	825	1650	391.8	391.8	1650	1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	323.3	323.3	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
Organic substances (mg l ⁻¹)							
Arginine ^a	-	-	-	59.23	-	-	-
Myo-Inositol	200	200	200	200	200	200	100
Nicotinic acid	5	3	5	5	5	5	1
Calcium pantothenate	-	3	-	-	-	-	-
Pyridoxine-HCl	1.2	3	1.2	1.2	1.2	1.2	1
Thiamine-HCl	10	3	10	10	10	10	10
Agar (g l ⁻¹)	6	-	7	6	6	7	7
Charcoal (%)	-	-	-	-	-	-	0.1
Coconut water (%) ^a	-	-	-	10	-	-	-
Sucrose (g l ⁻¹)	30	20	30	30	30	30	30
Growth regulators (μM)							
2,4-D ^a	0.5	-	-	-	-	-	-
BA ^{PM}	1	-	1	-	2	1	-
NAA ^a	-	-	2	0.1	0.5	0.5	-
Putrescine ^a	-	-	-	500	100	-	-
Spermidine ^a	-	-	-	100	10	-	-
TDZ ^a	-	-	-	3	-	-	-
pH	5.6	5.7	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6

Avaliação dos transformantes

A primeira classificação das mudas transformadas será realizada a partir da avaliação da expressão de β-glucuronidase (atividade GUS) 6 dias após a co-cultura com *A. tumefaciens*. A verificação da atividade GUS será realizada a partir da coloração/incubação das folhas em um substrato contendo 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-glucoronide de acordo com o procedimento de Jefferson et. al. (1987). As plantas que apresentarem atividade GUS serão selecionadas

Afim de checar a capacidade de transformação do genótipo será repetido o experimento acima 2 semanas, 1 mês e 2 meses após a co-cultura com *A. tumefaciens*.

Além disso, será avaliada a expressão de hemaglutinina (HA) utilizando um anticorpo comercial específico para hemaglutinina (Anti-HÁ). As plantas que expressarem hemaglutinina serão transferidas para casa de vegetação.

Cultivo

ORÇAMENTO

Arabidopsis	
R\$0,40/ unidade	R\$20,00
Purificar RNAm	
RNA Oligotex	R\$1090,00
Transcriptase Reversa	
(AMV), 10-20u/ul, 200 u.	R\$885,00
Enzima Ligase	
T4 DNA ligase, 5u/ul, 200 u.	R\$439,00
Enzima de Restrição	
BGL II 2000 u.	R\$558,00
PCR	
1 set dNTP (4 nucleotídeos)	R\$380,00
1Taq polimerase + tampão (Phoneutria) 500 u. 100 µl	R\$200,00
Primers (Alpha DNA +- 20 bases)	R\$40,00
Anti-hemaglutinina monoclonal anti-HA 12CA5	R\$ 272,00
Linhagem <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (doação)	
Antibióticos	
Canamicina Citotec 10g	R\$213,30
Cefotaxima (10.000µg) 100ml LGCBio	R\$63,00
Luvas descartáveis	
R\$ 9,90/unidade x 73 u.	R\$772,70
Micropipetas	
P ₁₀ (2u.), P ₁₀₀ (1u.), P ₁₀₀₀ (1u.)	R\$1.530,00

Microtubos	
1,5 mL	R\$50,96
0,2ml	R\$98,80
Garrafas para cultivo celular	
Biosystems. 200 UNID 25cm ²	R\$2.720,00
Casa de vegetação (infra-estrutura, mão de obra)	
R\$1000,00/mês	R\$10.000,00
Metais Pesados	
Será coletado de áreas contaminadas	
Adubos	
NPK 20Kg	R\$63,00
PA 20Kg	R\$68,00
Orgânico Terra Vegetal	R\$88,50
Esclerosiana	
R\$0,40/ unidade	R\$40,00
Vasos Nº10	
R\$22,00/ unidade	R\$1.600,00
Análises Biogeoquímicas	
200 = R\$10.000,00	R\$10.000,00
TOTAL:	R\$31.192,26

REFERÊNCIAS

Allard, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. Rio de Janeiro, GB (Brazil). Ed. Edgard Bliicher. 1971. 381 p.

C. R. Fonsêca, S. Soares, J. O. Siqueira, J. G. Carvalho, F. M. S. Moreira, P. H. Graziotti. **Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre**. Rev. Bras. Fisiol. Veg. vol.12 no.3 Lavras 2000. Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 37, Lavras, MG, 37200-000.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - [Embrapa Florestas](#) Sistemas de Produção, 4 ISSN 1678-8281 Versão Eletrônica Ago./2003

Esteban Roberto González, Alexander de Andrade, Ana Letícia Bertolo, Gisele Coelho Lacerda, Raphael Tozelli Carneiro, Valéria A. Prado Defávare, Mônica T. Veneziano Labate and Carlos Alberto Labate. **Production of transgenic *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system**. Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, CP 83, CEP 13400-970, Piracicaba-SP, Brazil. ACorresponding author; email: calabate@carpa.ciaagri.usp.br

Ji-Ming Gong, David A. Lee, and Julian I. Schroeder. **Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis***. Division of Biological Sciences and Center for Molecular Genetics, Cell and Developmental Biology Section, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093-0116. Communicated by Emanuel Epstein, University of California, Davis, CA, July 1, 2003 (received for review March 17, 2003).

Murashige T and Skoog F (1962). **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol Plant* 15: 473-497.

R. C. Quisen. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo. Programa de pós-graduação em agronomia produção vegetal.

RIBEIRO FILHO, M.R. CURI, N. SIQUEIRA, J.O. MOTTA, P.E.F. da. **Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.23, p.453-464. 1999.

