

Universidade do Minho

Escola de Ciências



Sara Manuela Carneiro Martins

**Expressão de cardosinas A e B em linhas
transgênicas de *Arabidopsis thaliana* –
caracterização fenotípica e imunolocalização em
flores**

Tese de Mestrado

Fisiologia Molecular de Plantas

Trabalho e laborado sobre a orientação da:

Professora Susana Pereira e Doutora Diana Soares da Costa

Março 2011

DECLARAÇÃO

Nome: Sara Manuela Carneiro Martins

Endereço electrónico: smartins@fc.up.pt

Telefone: 918807931

Número do Bilhete de Identidade: 13009774

Título tese

Expressão de cardosinas A e B em linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* – caracterização fenotípica e imunolocalização em flores

Orientadoras:

Professora Susana Pereira

Doutora Diana Soares da Costa

Ano de conclusão: 2011

Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.), APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, / /

Assinatura: _____

Agradecimentos

À Professora Susana e ao Professor Pissarra, pela oportunidade de trabalhar no grupo e pela introdução ao mundo das cardosinas. Pela paciência e compreensão que sempre demonstraram e pela transmissão de conhecimento que sempre foram e serão enriquecedoras tanto a nível profissional como pessoal.

À Doutora Diana, Dr^a Cláudia e Dr^a Ana que desde o início me ajudaram e orientaram no laboratório. Quero agradecer não só pelos ensinamentos científicos mas também pela amizade e apoio que me transmitiram.

Aos meus colegas de laboratório, aos que entretanto seguiram os seus caminhos por outros rumos e aos recém-chegados à casa :) pelo apoio, boa disposição e pelos momentos de convívio que me fizeram sentir em casa.

Aos vizinhos do lab 2.60, pela colaboração para um ambiente saudável de amizade e convívio entre os laboratórios e interajuda.

Aos meus amigos, pelas palavras de apoio mesmo quando não percebiam do que estava a falar, pela paciência em ouvir os desabaços e pela compreensão. Quero de agradecer em especial à Alexandra, pela paciência em esperar que acabasse de colher as flores e pelo constante apoio. :)

Aos meus pais e à minha irmã, que sempre foram e serão os pilares da minha vida. Obrigada pelo apoio e pelas oportunidades que sempre me deram e que fazem de mim o que hoje posso ser.

Expressão de cardosinas A e B em linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* – caracterização fenotípica e imunolocalização em flores

As cardosinas A e B são proteinases aspárticas vegetais presentes em grande abundância nas flores de cardo. No entanto, apesar das suas semelhanças estruturais e moleculares, estas proteínas têm padrões de acumulação diferentes nas flores: a cardosina A é vacuolar e está presente nos vacúolos de armazenamento proteico das papilas estigmáticas, enquanto a cardosina B é secretada e está presente na matriz extracelular do tecido de transmissão. Este facto contribuiu para o crescente interesse nestas proteinases não apenas no que diz respeito às suas possíveis funções, mas também a nível do estudo do trânsito intracelular. Nesse sentido têm sido realizados muitos estudos de forma a elucidar as funções e vias de trânsito seguidas por estas proteínas tanto no sistema nativo como em sistemas heterólogos como tabaco e *Arabidopsis*. Neste estudo pretendeu-se também avaliar os possíveis efeitos da sobreexpressão destas cardosinas utilizando a planta *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo, a expressar de forma estável as cardosinas sob o controlo do promotor 35S. Os dados da caracterização fenotípica revelaram que as plantas transformadas não são afectadas ao nível da viabilidade ou fertilidade, no entanto, sofrem um atraso no desenvolvimento em relação às plantas *wild type*. Foi também realizada imunolocalização das cardosinas A e B em flores fechadas e abertas de *Arabidopsis* expressando de forma estável as proteínas. Foi observada uma acumulação das cardosinas no citoplasma das células das flores, embora em alguns casos tenha sido possível observar-se cardosina A nos vacúolos das células do tapete e grãos de pólen assim como cardosina B nos vacúolos das células do tapete, em ambos os casos em flores fechadas e quando induzida a expressão desde o início do desenvolvimento. Para além das diferenças de localização a nível intracelular também se verificaram diferenças no padrão de acumulação de ambas as cardosinas a nível tecidual, sendo notória uma marcação mais evidente da cardosina A nas células abaixo das papilas estigmáticas no cortex do estigma e também na zona nucelar, enquanto nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B na zona nucelar não se observou marcação. Pela análise dos dados obtidos, pode-se constatar que a *Arabidopsis* é um bom modelo para o estudo das cardosinas dado que é capaz de expressar correctamente estas proteínas sem sofrer alterações fenotípicas relevantes que afectem a obtenção da geração seguinte.

Expression of cardosins A and B in transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* – phenotypic characterization and immunolocalization in flowers

Cardosins A and B are plant aspartic proteinases present in high amount in cardoon flowers. However, apart their structural and molecular similarities, these proteins have different accumulation patterns in the flower tissues: cardosin A is a vacuolar protein present in the protein storage vacuoles of stigmatic papillae, while cardosin B is secreted to the extracellular matrix of the transmitting tissue. These facts contributed for the growing interest on these proteinases not only regarding their functions but also in what concerns the study of their intracellular trafficking pathways. Therefore, several studies have been performed to elucidate their physiological roles and trafficking pathways both in the native system and in heterologous systems as tobacco and *Arabidopsis*. One of the main goals of the present study was to evaluate the possible effects of cardosins over expression using *Arabidopsis thaliana* as heterologous system, stably expressing cardosins under the control of 35S promoter. The data retrieved from the phenotypic characterizations revealed that the transgenic plants are not affected in terms of viability or fertility, however they suffer a delay in the development when comparing to *wild type* plants. Immunolocalization studies were also performed to localize cardosins A and B in closed and opened flowers of *Arabidopsis* plants stably expressing these proteins. Cardosins were found to accumulate in the cytoplasm of the cells, though in some cases cardosin A has been observed in the vacuoles of tapetum cells and in pollen grains, as well as cardosin B in the vacuoles of tapetum cells, in both cases in closed flowers when expression was induced from the beginning of development. Besides the differences observed in terms of intracellular localization, the tissue distribution of both cardosins was also different being notorious the labelling of cardosin A in the cells below stigmatic papillae, in the stigma cortex and also in the nucelar region of the ovule, while in the plants expressing cardosin, the labeling was not observed in the nucelar region. Comparing the overall results with previous data we can suggest that *Arabidopsis* is a good model for the study of cardosins given the fact that it can correctly express both cardosins without undergoing relevant phenotypic modifications that affect the viability of forthcoming generations.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. Proteinases aspárticas.....	2
1.1.1. Proteinases aspárticas de plantas.....	3
1.1.1.1. Cardosinas.....	6
1.2. Modelos de estudo.....	9
1.2.1. Cardo.....	9
1.2.1.1. Expressão e localização de cardosinas A e B.....	10
1.2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
1.2.2.1. Expressão heteróloga de cardosinas A e B.....	12
1.3. Sistema indutível.....	13
1.4. Objectivos.....	15
2. Material e Métodos.....	18
Material Biológico.....	19
Caracterização do desenvolvimento das linhas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
Processamento do material biológico para imunofluorescência.....	20
Preparação de lâminas revestidas com Poli – L – Lisina.....	20
Imunofluorescência.....	21
Processamento do material biológico para microscopia electrónica.....	21
Imunocitoquímica.....	22
Coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter GUS nas flores.....	23

3. Resultados.....	24
3.1. Caracterização fenotípica das linhas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.1.1. Ensaio preliminar.....	25
3.1.1.1. Comprimento da raiz principal.....	25
3.1.1.2. Comprimento da zona pilosa das raízes principais.....	28
3.1.1.3. Número de raízes laterais.....	30
3.1.1.4. Cotilédones.....	32
3.1.1.5. Número de hastes principais.....	34
3.1.1.6. Altura das hastes florais.....	36
3.1.1.7. Número de flores.....	38
3.1.1.8. Número de silíquas.....	40
3.1.1.9. Tamanho das silíquas.....	42
3.1.2. Segundo ensaio.....	44
3.1.2.1. Comprimento da raiz principal.....	45
3.1.2.2. Número de raízes laterais.....	47
3.1.2.3. Número de flores.....	49
3.2. Coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter GUS nas flores.....	51
3.3. Localização das cardosinas A e B nas flores.....	52
3.3.1. Localização da cardosina A em flores.....	54
3.3.2. Localização da cardosina B em flores.....	60
3.3.3. Estudos preliminares de imunolocalização intracelular da cardosina A.....	68
4. Discussão.....	69
4.1. Caracterização fenotípica das linhas transgênicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
4.2. Expressão e localização das cardosinas A e B nas flores.....	72
5. Conclusão.....	77
6. Bibliografia.....	79

Índice de Figuras:

Figura 1.1 – Representação esquemática de zimogéneos de algumas proteínases aspárticas.....	4
Figura 1.2 – Modelo proposto para o processamento proteolítico da procardosina A.....	8
Figura 1.3 – <i>Cynara cardunculus</i>	9
Figura 1.4 – <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Figura 1.5 – Representação esquemática do sistema de activação LhG4.....	14
Figura 1.6 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhGR, quimicamente indutível.....	15
Figura 3.1 – Comparação do comprimento das raízes principais de plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	27
Figura 3.2 – Comparação do comprimento da zona pilosa das raízes principais das plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	29
Figura 3.3 – Comparação do número de raízes laterais de plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	31
Figura 3.4 – Comparação do tamanho dos cotilédones de plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	33
Figura 3.5 – Comparação do número de hastes principais de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	35
Figura 3.6 – Comparação da altura das hastes florais de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	37
Figura 3.7 – Comparação do número de flores de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	39
Figura 3.8 – Comparação do número de síliquas de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	41
Figura 3.9 – Comparação do tamanho das síliquas de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	43
Figura 3.10 – Comparação do comprimento das raízes de plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i> ao longo do desenvolvimento.....	46
Figura 3.11 – Comparação entre o número de raízes laterais de plântulas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	48

Figura 3.12 – Comparação do número de flores de plantas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	50
Figura 3.13 – Detecção histoquímica <i>in situ</i> da expressão do gene repórter <i>Gus</i> em flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	52
Figura 3.14 – Secções longitudinais de flores de <i>Arabidopsis</i>	54
Figura 3.15 – Imunolocalização de cardosina A em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> induzidas com dexametasona aquando do aparecimento de hastes florais.....	55
Figura 3.16 – Imunolocalização de cardosina A em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> induzidas com dexametasona desde o início da germinação.....	57
Figura 3.17 – Controlos de imunolocalização da cardosina A em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	59
Figura 3.18 – Imunolocalização de cardosina B em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> induzidas com dexametasona aquando do aparecimento de hastes.....	61
Figura 3.19 – Imunolocalização de cardosina B em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> induzidas com dexametasona desde o início da germinação.....	63
Figura 3.20 – Controlos de imunolocalização da cardosina B em secções de flores de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	65
Figura 3.21 – Imunolocalização da cardosina A em secções de ovários e anteras de flores abertas de linhas transgénicas de <i>Arabidopsis</i>	68

Índice de tabelas:

Tabela 3.1 – Comparação dos valores máximos (média) dos diferentes parâmetros analisados nas plantas de linhas transgênicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	44
Tabela 3.2 – Comparação dos valores máximos (média) referentes aos diferentes parâmetros analisados nas plantas de linhas transgênicas de <i>Arabidopsis</i> e <i>wild type</i>	51
Tabela 3.3 – Síntese e comparação da localização das cardosinas A e B nas plantas transgênicas induzidas desde o início (Dex I) e aquando do aparecimento das hastes florais (Dex H).....	67

Lista de Abreviaturas:

Anti-A – Anticorpo anti-cardosina A

Anti-B – Anticorpo anti-cardosina B

APs – Proteases Aspárticas (do inglês: *Aspartic Proteases*)

Asp – Ácido aspártico/Aspartato (Abreviatura do aminoácido)

BSA – Albumina Sérica Bovina (do inglês: *Bovine Seric Albumin*)

CDR1 – (do inglês: *constitutive disease resistance 1*)

CLSM – Microscópio Confocal de Varrimento a Laser (do inglês: *Confocal Laser Scanning Microscopy*)

Dex – Dexametasona

DMF – Dimetilformamida

DMSO – (do inglês: *dimethyl sulfoxide*)

ER – Reticulo endoplasmático (do inglês: *endoplasmatic reticulum*)

Gly – Glicina (Abreviatura do aminoácido)

GUS – β -glucuronidase

Hsp90 – (do inglês: *heat shock protein 90*)

LRWhite – (do inglês: *London Resin White*)

MCS – (do inglês: *multiple cloning site*)

ON – (do inglês: *overnight*)

OW – (do inglês: *overweekend*)

PBS – Tampão fostato salino (do inglês: *phosphate buffer saline*)

PCS1 – (do inglês: *promotion of cell death 1*)

PEG – Polietilenoglicol (do inglês: *polyethylene glycol*)

PLD α – Fosfolipase D α (do inglês: *phospholipase D α*)

PSI – (do inglês: *Plant-Specific Insert*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês: *ribonucleic acid*)

SAPLIP – (do inglês: *saposin-like protein*)

Ser – Serina (Abreviatura do aminoácido)

TBS – (do inglês: *tris buffer saline*)

Thr – Treonina (Abreviatura do aminoácido)

X-Gluc - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido

1. Introdução

1.1. Proteinases aspárticas

As proteases pertencem a uma classe heterogénea de enzimas presentes em todo o tipo de organismos e que estão envolvidas em vários mecanismos fisiológicos. Existem dois grupos enzimáticos de proteases: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases actuam nas regiões amino (N-) e carboxi (C-) terminais da proteína removendo aminoácidos sequencialmente, e as endopeptidases (também conhecidas por proteinases) actuam nas regiões internas das cadeias polipeptídicas (Simpson, 2007; Van der Hoorn, 2008). As proteinases ou endopeptidases podem ainda ser agrupadas segundo o seu mecanismo catalítico em proteinases aspárticas, cisteínicas, serínicas e metaloproteases (Van der Hoorn, 2008).

As proteinases aspárticas (APs, EC 3.4.23) são endopeptidases que se encontram numa grande variedade de seres vivos, como por exemplo bactérias, protozoários, fungos, animais, plantas e também em vírus (Dunn, 2002). As APs têm sido alvo de grande interesse por parte da comunidade científica, não só pela sua ampla distribuição, mas também por estarem envolvidas em vários processos biológicos, como a regulação da pressão arterial e a digestão. Estão também envolvidas em várias patologias de incidência mundial como é o caso da hipertensão, malária, doença amilóide, candidíase, SIDA e cancro (Cooper, 2002).

Devido à importância e à descoberta de cada vez mais APs e outras peptidases, foi criada uma base de dados que compilasse toda a informação disponível sobre estas enzimas – a MEROPS (Rawlings, 2008). Nesta base de dados, as peptidases estão agrupadas em 14 famílias, com base na sua sequência aminoacídica, que por sua vez estão englobadas em 6 clãs, baseados na relação evolutiva e estrutura terciária (Rawlings, 2008; Simões e Faro, 2004).

As APs são muito semelhantes entre espécies. Quanto à estrutura terciária, esta é idêntica entre as APs, sendo estas bilobadas, ou seja, formadas por dois lobos ou domínios, entre os quais se encontra o centro catalítico das enzimas. Este centro catalítico é formado por dois resíduos de aspartato, geralmente com características hidrofóbicas (Davies, 1990; Van der Hoorn, 2008).

As APs são sintetizadas como zimogénios, isto é, como formas precursoras das enzimas, sendo necessário ocorrer a clivagem dum fragmento de activação para activar a enzima. A conversão dos zimogénios em enzimas activas pode ocorrer com o auxílio de outras moléculas, ou então, através do autoprocessamento catalítico (Khan *et al*, 1999).

Embora exista muita informação sobre as proteinases ainda muito há por descobrir sobre as mesmas, nomeadamente no que diz respeito às suas funções biológicas. De acordo com Van der Hoorn (2008) não se conhecem substractos relevantes para a maioria das proteases, e algumas catalizam reacções não proteolíticas. As proteinases parecem, no entanto, ter um papel importante nas plantas já que mutações nestes genes são, muitas vezes, letais. É por isso necessário, a realização de estudos a nível da localização, tipo de substratos e regulação da actividade das proteinases (Van der Hoorn, 2008).

1.1.1. Proteinases aspárticas de plantas

As APs vegetais foram já identificadas em diversas espécies vegetais, quer em gimnospérmicas, como no género *Pinus*, quer em dicotiledóneas, como no cardo (*Cynara cardunculus*), *Arabidopsis thaliana*, pepino, planta do cacau, planta do tabaco, girassol ou mesmo em plantas carnívoras como a *Nepenthes*, quer em monocotiledóneas, como a cevada (*Hordeum vulgare*), o milho (*Zea mays*), o arroz ou o trigo (Simões e Faro, 2004). Embora grande parte das APs tenha sido isolada de sementes e flores, p. ex. *Brassica napus* (planta do nabo), *Arabidopsis*, *Cynara cardunculus* (cardo), também já foram encontradas APs em outros órgãos/partes de plantas, como em folhas, p. ex. *Lycopersicum esculentum* (tomateiro), *Nicotiana tabacum* (tabaco) (Pissarra *et al*, 2007), grãos de pólen p. ex. *Zea mays* (milho) e raízes, p. ex. cevada (Mutlu e Gal, 1999; Simões e Faro, 2004).

As APs vegetais pertencem aos clãs AA e AD. Dentro do clã AA, as APs estão distribuídas pelas famílias A1, A3, A11 e A12, e também pela família A22 do clã AD. Tal como as outras APs, as APs vegetais da família A1 são activas a pH ácido, são inibidas pela pepstatina, possuem estrutura terciária semelhante e dois resíduos de ácido aspártico, responsáveis pela actividade catalítica (Simões e Faro, 2004). No entanto, as APs vegetais apresentam algumas características que as tornam únicas: a similaridade nas suas sequências aminoácidas e domínios (N-) e (C-) terminal, o local onde se encontra o resíduo catalítico de aspartato (Simões e Faro, 2004) e, na forma madura são enzimas de dupla cadeia (Vieira 2001, Ramalho-Santos 1997).

As APs vegetais partilham uma grande similaridade nas sequências aminoácidas, nos seus domínios (N-) e (C-) terminal (cerca de 60%) e possuem o resíduo catalítico de aspartato (Asp) nos motivos Asp-Thr-Gly (DTG) e Asp-Ser-Gly (DSG) presentes em cada um dos dois lobos

da enzima (Mutlu e Gal, 1999). No entanto, existe uma excepção na família A1, a chlapsina, uma AP extraída da alga unicelular *Clamydomonas reinhardtii* que possui em ambos os lobos as sequências catalíticas DTG (Simões e Faro, 2004).

Sendo sintetizados como zimogénios ou preproenzimas, as formas precursoras das APs vegetais possuem uma sequência N-terminal hidrofóbica, seguida de um pro-segmento com cerca de 40 aminoácidos, e de um domínio N-terminal e um domínio C-terminal, separados por uma inserção com cerca de 100 aminoácidos denominada por PSI (*Plant-Specific Insert*) (Figura 1.1). Tal como nas restantes APs, o processamento proteolítico inicia-se com a remoção da sequência sinal no lúmen do retículo endoplasmático (Simões e Faro, 2004).

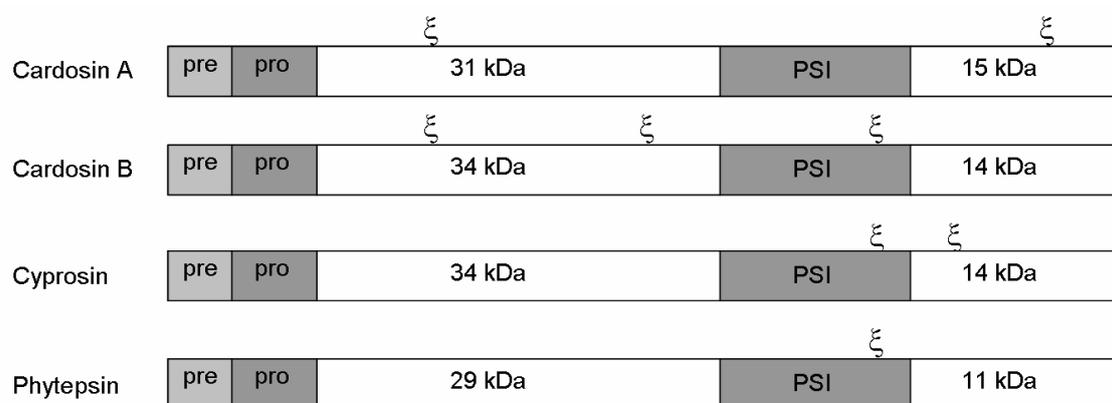


Figura 1.1 – Representação esquemática de zimogénios de algumas proteínases aspárticas.

Nesta figura podemos observar o péptido sinal (pre), o prosegmento (pro); o *Plant Specific Insert* (PSI) a separar as duas cadeias da forma madura destas proteínas, e ainda o local de N-glicosilação (ξ). (Adaptado de Pissarra *et al*, 2007)

Enquanto o prosegmento está presente em todas APs e está relacionado com a inactivação, correcto enrolamento, estabilidade e direccionamento do zimogénio, o PSI é uma inserção apenas identificada em algumas APs de plantas e que não apresenta qualquer similaridade com APs de origem microbiana ou animal. No entanto, o PSI apresenta uma homologia elevada com as saposinas (proteínas encontradas em mamíferos), sendo por isso, considerado uma *saposin-like protein* (SAPLIP) (Simões e Faro, 2004).

O PSI contém seis resíduos de cisteína, vários resíduos hidrofóbicos e um local de glicosilação conservado entre os membros da família das SAPLIPs. No entanto, o PSI possui uma característica única, uma troca nos domínios N- e C-terminal em relação às saposinas, designando-se, por essa razão, “swaposina” (Simões e Faro, 2004). Foram já propostas diversas funções para o PSI. Egas e colaboradores (2000) demonstraram que o PSI da cardosina A

funciona como indutor da libertação do conteúdo vesicular promovendo a destabilização das membranas lipídicas. Foi ainda sugerido um papel dos precursores das APs em mecanismos de defesa contra patogéneos ou fenómenos de morte celular programada. O PSI foi também implicado no trânsito intracelular, sendo proposto um possível papel no endereçamento das formas precursoras das APs vegetais para o vacúolo (Tormakangas *et al*, 2001; Teurachi *et al*, 2005). Foi realizado um estudo em que se removeu o PSI da fitepsina (uma AP de cevada) passando esta AP a ser secretada em protoplastos de tabaco, sendo proposto que o PSI funciona como sinal de endereçamento vacuolar neste sistema (Tormakangas *et al*, 2001). Esse mesmo estudo revelou que a deleção do PSI altera a via de saída do retículo endoplasmático (ER), levantando a hipótese do PSI conter ou funcionar como sinal de exportação do ER. Teurachi e colaboradores (2005) removeram a região do PSI a duas APs de soja (em que uma se acumula nos vacúolos de armazenamento proteico e outra nos vacúolos líticos) e constataram que apenas foi alterado o trajecto intracelular da AP que se acumula nos vacúolos líticos, levando os autores a propor que o papel de determinante vacuolar atribuído ao PSI dependeria do tipo de vacúolo em que a AP se acumula. Estudos mais recentes, revelaram que o PSI da cardosina A isolado e fundido com a proteína fluorescente m-Cherry direcciona a construção correctamente para o vacúolo em células da epiderme foliar de tabaco, reforçando mais uma vez que o PSI está implicado no direccionamento vacuolar (Pereira *et al*, em submissão).

Com base na homologia com a sequência de APs conhecidas de cardo, cevada e tabaco, foram obtidas, *in silico*, 51 sequências de genes de *Arabidopsis*. Estas sequências foram artificialmente agrupadas em três categorias baseando-se no seu domínio organizacional putativo e motivo do centro activo: *nucellin-like*, atípicas e típicas, sendo que estas últimas contêm (geralmente) o domínio PSI na molécula precursora da proteína (Faro e Gal, 2005; Simões e Faro, 2004). Estas premissas baseiam-se em dados obtidos *in silico* e não existem ainda dados laboratoriais suficientes que suportem esta classificação. Pelo que, relativamente às proteinases típicas, Faro e Gal (2005) identificaram 5 membros pertencentes a este grupo de proteinases em *Arabidopsis* (grupos A1 e A2), dos quais 3 genes codificam proteinases aspárticas contendo o domínio PSI (*saposin-like*) (At1g11910, At1g62290, e At4g04460), embora apenas para primeira tenha sido descrito o isolamento de um cDNA, as restantes foram inferidas pela semelhança com proteinases aspárticas animais (Faro e Gal, 2005).

São apenas conhecidas as funções biológicas de duas proteases aspárticas “pepsin-like” de plantas, da família A1, clã AA, a CDR1 e a PCS1 (Van der Hoorn, 2008). A CDR1 (Constitutive

Disease Resistance 1) actua na resistência às doenças e é uma enzima apoplástica atípica, enquanto a PCS1 (Promotion of Cell Survival) inibe a morte celular durante a gametogénese e embriogénese (Van der Hoorn, 2008). O gene é expresso especificamente em gametófitos e sementes em desenvolvimento e quando expresso ectopicamente o *PCS1* bloqueia a morte celular programada na antera inibindo a libertação de pólen (Ge *et al*, 2005).

De forma a conhecer-se mais sobre as APs, têm sido desenvolvidos estudos de localização intracelular, para além da sua localização a nível tecidular, tendo as APs, sido localizadas em corpos proteicos e posteriormente em vacúolos líticos de sementes de cevada (Martilla *et al*, 1995). Existem, no entanto, estudos que revelam que as APs se acumulam principalmente em vacúolos de armazenamento proteico (Simões e Faro, 2004), como é o caso da cardosina A, que se acumula nos vacúolos de armazenamento proteico nas papilas estigmáticas das flores de cardo (Ramalho-Santos *et al*, 1997). Apesar da maioria das APs ser vacuolar, há excepções como a cardosina B, que foi encontrada na matriz extracelular do tecido de transmissão das flores de cardo (Vieira *et al*, 2001).

Têm sido realizados vários estudos de forma a elucidar os papéis fisiológicos das APs vegetais, já que estes ainda não se encontram bem caracterizados. Deste modo, Ramalho-Santos e colaboradores (1997) colocaram a hipótese da cardosina A (uma AP vegetal) estar implicada em funções como a senescência ou, morte celular programada. Colocou-se ainda, a hipótese da cardosina A estar envolvida na reprodução através da interacção pólen-pistilo (Ramalho-Santos *et al*, 1997; Pimentel *et al*, 2007). Chen e Foolad (1997) propuseram que a nucelina poderia ter, também, um papel na morte celular programada das células nucelares da cevada. Para além destas possíveis funções, Simões e Faro (2004) vieram propor que as APs vegetais poderiam ter um papel na resposta ao stress e processamento e/ou degradação de proteínas.

1.1.1.1. Cardosinas

As cardosinas são APs vegetais inicialmente isoladas das flores do cardo e existem em grandes quantidades nas flores chegando a atingir 60% do teor proteico total presente nos estigmas maduros desta planta (Vieira *et al*, 2001). Para além destas APs, o cardo contém ainda outra família de APs designadas ciprosinas (Ramalho-Santos *et al*, 1997).

As cardosinas têm vindo a ser extensivamente estudadas, sendo as cardosinas A e B as mais bem caracterizadas (Ramalho-Santos *et al*, 1997; Verissimo *et al*, 1996; Vieira *et al*, 2001). Ambas apresentam as características comuns às restantes APs, possuindo o PSI tal como algumas APs vegetais (Pissarra *et al*, 2007).

Estas APs são sintetizadas a partir de uma enzima precursora, com sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático, prosegmento N-terminal, seguido das duas unidades N- e C-terminal, separadas pelo PSI (Pissarra *et al*, 2007).

Foram entretanto identificadas as cardosinas C, D (Pimentel *et al*, 2007), E, F, G e H (Sarmiento *et al*, 2009) para além das já conhecidas A e B. As cardosinas C e D também são designadas por cardosinas A-like por possuírem uma homologia de cerca de 90% com a cardosina A (Pimentel *et al*, 2007). Estas proteínas tornam-se por isso, difíceis de distinguir a nível de estudos de expressão e sinalização.

As cardosinas A e B possuem a estrutura primária típica das APs vegetais (Figura 1.1). Embora ambas possuam locais de N-glicosilação, a cardosina A possui também um motivo RGD no final da cadeia maior (N-terminal). Este motivo é um domínio de ligação a integrinas, do qual se pensa ter detectado um suposto receptor no pólen, sendo este motivo homólogo ao SLR1 da *Arabidopsis* (Pimentel *et al*, 2007). Dado que a cardosina A se acumula em abundância nas papilas estigmáticas do cardo e possui o motivo RGD, foi sugerido um possível envolvimento da cardosina A nas interações pólen-pistilo (Pimentel *et al*, 2007; Pissarra *et al*, 2007). Simões e colaboradores (2005) identificaram a fosfolipase D α (PLD α), presente no pólen, como sendo uma proteína de ligação à cardosina A através do domínio C2 presente na PLD α . Este domínio reconhece os motivos RGD e KGE da cardosina A, interagindo com os mesmos. Os autores sugeriram que estes dados apontam para uma acção, do complexo de ligação entre a cardosina A e a PLD α , em processos degenerativos como os envolvidos na resposta ao stresse, senescência e interações pólen-pistilo.

Ramalho Santos e colaboradores propuseram, em 1998, um modelo para o processamento proteolítico da cardosina A. O modelo propunha que o processamento acontece de forma sequencial, em que o primeiro local de clivagem a ser processado é entre a cadeia maior (31 kDa) e o PSI, dando origem a duas formas intermédias, uma correspondente à cadeia maior com pro-segmento, e outra à cadeia menor (15 kDa) com o PSI. De seguida ocorre clivagem entre o PSI e a cadeia menor, e a remoção do pro-segmento completa o processamento da proteína (Figura 1.2).

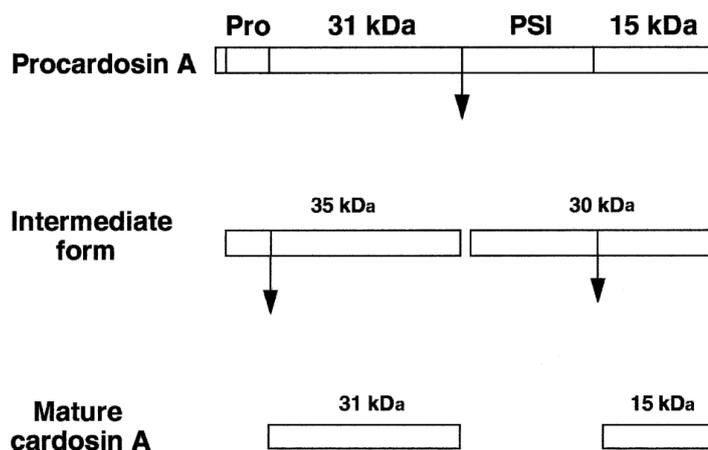


Figura 1.2 – Modelo proposto para o processamento proteolítico da procardosina A.

Os locais de clivagem entre o prosegmento (Pro) e o fragmento de 31 kDa, entre o fragmento de 31 kDa e o PSI, e entre o PSI e o fragmento de 15 kDa estão indicados pelas setas (Adaptado de Ramalho-Santos, 1997)

Embora ainda não tenha sido possível a elucidação do processamento proteolítico da cardosina B, pensa-se que a mesma será sintetizada e sofrerá um processamento proteolítico de forma análoga ao da cardosina A. No entanto, admite-se um processamento mais rápido do que o da cardosina A, já que em estudos de expressão realizados em *Arabidopsis thaliana* (sistema heterólogo), foi detectada maioritariamente a forma processada da cardosina B e em menores quantidades a forma precursora da mesma, levando a crer que, neste sistema, o processamento da cardosina B seria mais rápido (Soares da Costa *et al*, 2010).

Através da análise da localização celular e tecidual das cardosinas, têm já sido apontados vários papéis fisiológicos possíveis para estas proteínas. Foi apontado o envolvimento das cardosinas na reprodução sexual quer a nível da remodelação do tecido de transmissão quer a nível da interacção pólen-pistilo. Pensa-se também que as cardosinas podem ter um papel na morte celular programada e defesa contra patógenos (Ramalho-Santos *et al*, 1997; Figueiredo *et al*, 2006). Duarte e colaboradores (2006), devido à localização da cardosina B no tecido de transmissão, propuseram um possível papel na sinalização e alongamento do tubo polínico.

1.2. Modelos de estudo

1.2.1. Cardo

Cynara cardunculus, comumente conhecida por cardo, é uma planta de elevado valor económico devido à sua utilização na indústria alimentar, pois as suas flores são utilizadas em Portugal na manufactura do queijo, devido à sua capacidade de coalhar o leite (Verissimo *et al*, 1995). Esta planta vive de 6 a 8 anos e floresce de Maio a Agosto, pertence à classe das Angiospérmicas, ordem das Dicotiledóneas, família das Asteraceae (Sampaio, 1988).

O cardo é uma planta bianual e cresce livremente nas zonas do Mediterrâneo, nomeadamente no Centro e Sul de Portugal Continental, Madeira e Ilhas Canárias (Figura 1.3A). São plantas herbáceas perenes com estames erectos e folhas espinhosas encaixadas na base de cada segmento (Pissarra *et al*, 2007). As flores de cardo são hermafroditas e ocorrem em inflorescências que estão organizadas em capítulos compactos (Figura 1.3B). Em cada flor é possível observar-se dois carpelos unidos no estigma (Duarte *et al*, 2006). Cada ovário possui apenas um óvulo e este é anátropo e crassinucelado, sendo composto pelos tegumentos externo e interno a circundar o nucelo (Figueiredo *et al*, 2006).

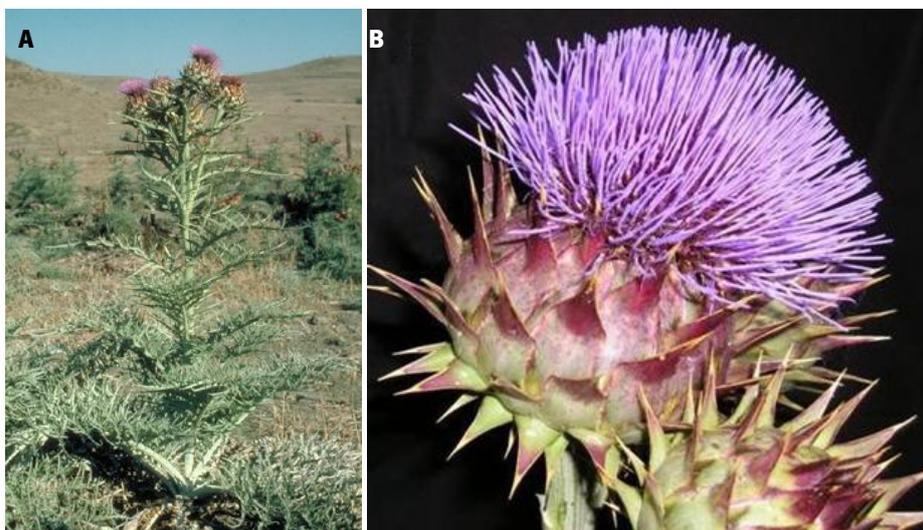


Figura 1.3 – *Cynara cardunculus*

A – Planta no seu habitat natural; B – Pormenor da inflorescência (Adaptado Pissarra *et al*, 2007)

1.2.1.1. Expressão e localização das cardosinas A e B

Foram já realizados vários estudos referentes à expressão e localização das cardosinas A e B em cardo. No que respeita à flor de cardo, os primeiros estudos revelaram que a cardosina A se encontra presente em abundância nesse órgão, tendo sido localizada nos vacúolos de armazenamento proteico das papilas estigmáticas e também, embora com menor densidade, nas células da epiderme do estilete (Ramalho-Santos *et al*, 1997). A cardosina B, por seu lado, foi detectada na matriz extracelular do tecido de transmissão do estigma (Vieira *et al*, 2001). Duarte e colaboradores (2006) confirmaram estes dados, detectando a cardosina A ao longo do desenvolvimento floral, principalmente no estigma, mas também na epiderme do estilete. Em contraste, não foi detectada cardosina B nas camadas mais superiores do estigma, estando esta proteína confinada à zona do tecido de transmissão. Foi também detectada a presença de cardosina B no óvulo, em simultâneo com a degeneração do nucelo, antes da polinização. Após este fenómeno, a expressão da cardosina B passou a ser restrita à camada exterior das células nucelares (Figueiredo *et al*, 2006). A cardosina B foi ainda detectada por imunolocalização nas pétalas, remanescentes do tapete e no interior dos grãos de pólen (Soares da Costa, 2009). Ainda no que respeita à cardosina B, foram detectados transcritos desta proteína no estigma no início do desenvolvimento floral, começando a decrescer ao longo do mesmo. No estilete, foram também detectados transcritos no início do desenvolvimento floral, mas, neste caso, aumentavam ao longo do mesmo (Vieira *et al*, 2001; Soares da Costa, 2009). A cardosina B foi detectada na sua forma precursora no estigma até à abertura da inflorescência; no estigma e estilete, esta proteína foi detectada na sua forma processada em todos os estádios de desenvolvimento floral (Soares da Costa, 2009).

No que se refere à cardosina A, a detecção de transcritos desta proteína no estigma e estilete, revelou-se estável ao longo do desenvolvimento. Na inflorescência senescente, os níveis de transcritos vão diminuindo nos órgãos referidos. No ovário, os níveis de transcritos de cardosina A são também constantes, embora com menor expressão que no estilete e estigma. Quanto à expressão da cardosina A, a forma precursora da proteína é detectada ao longo do desenvolvimento floral, incluindo no ovário, diminuindo com a senescência da inflorescência (dados não publicados).

Estudos de expressão e localização realizados na semente de cardo da cardosina A sugerem o seu envolvimento no desenvolvimento pós-embrionário (Pereira *et al*, 2008). No

mesmo trabalho, a cardosina A foi detectada nos corpos proteicos e também, na forma precursora, na parede celular das células embrionárias, diferindo da sua distribuição nas flores, o que levou os autores a sugerir que o processamento e transporte intracelular desta proteína sejam dependentes do tecido em que é expressa. A localização observada neste trabalho, sugeriu um possível envolvimento da cardosina A na desestabilização da membrana lipídica (via PSI) durante as trocas de solutos e água, durante a germinação da semente. Foi também apresentada a hipótese da cardosina A estar envolvida na conversão e /ou degradação das proteínas de armazenamento (Pereira *et al*, 2008). Estudos da cardosina B em sementes demonstraram que, tal como nas flores, a expressão desta proteína está localizada em tecidos e órgãos que se encontram sob alterações metabólicas e morfológicas intensas. Estes resultados, juntamente com os obtidos anteriormente, reforçam a ideia de uma especialização das vias de trânsito de acordo com as necessidades das células (Oliveira, 2009). As vias de trânsito seguidas pela cardosina B em sementes mostraram que a proteína segue directamente do reticulo endoplasmático para os corpos proteicos (Oliveira, 2009).

Devido às dificuldades impostas pela planta nativa, nomeadamente o seu longo ciclo de vida e tamanho, recorreu-se ao estabelecimento de culturas de tecido caloso, de cardo de modo a facilitar o estudo das cardosinas neste sistema. Após caracterização desse tecido, no que diz respeito à acumulação de cardosinas A e B, verificou-se a existência de transcritos referentes a ambas cardosinas, estas seriam produzidas *de novo* neste sistema (Oliveira *et al*, 2009). Em relação à expressão das cardosinas no tecido caloso, foram detectadas as formas precursoras das cardosinas A e B, no entanto, apenas a forma madura da cardosina A foi detectada, sugerindo diferentes formas de processamento para as diferentes proteínas neste sistema. As cardosinas A e B foram localizadas no reticulo endoplasmático, levando os autores a propor que estas proteínas ficariam retidas no reticulo endoplasmático devido à remoção antecipada do prosegmento (Oliveira *et al*, 2009). Os autores sugerem a existência de uma expressão basal das cardosinas cuja expressão é despoletada quando o metabolismo celular aumenta.

1.2.2. *Arabidopsis thaliana*

A *Arabidopsis thaliana* é uma planta pertencente à classe das Angiospérmicas, ordem das Dicotiledónias, família das Brassicaceae (ou Cruciferae), estando distribuída a nível mundial

desde a Europa, Ásia e América do Norte. Existem dois ecótipos que podem ser colhidos das populações naturais e que são aceites para estudos experimentais: Columbia e Landsberg.

A *Arabidopsis* constitui um bom modelo de estudo pois é uma planta de pequeno porte e ciclo de vida curto, sendo capaz de produzir descendência numerosa e é facilmente manipulável em laboratório (Figura 1.4A). É uma planta bem caracterizada fenotipicamente, possui um genoma pequeno e é facilmente manipulada geneticamente (Meike, 1998). Para além destas características, a *Arabidopsis* está próxima filogeneticamente de outras plantas Dicotiledóneas e é aceite como planta modelo devido ao conhecimento na genómica e aos recursos que estão disponíveis para o seu estudo (Somerville e Koornneef, 2002). As flores ocorrem em inflorescências e embora sejam pequenas (2mm) (Meike, 1998) são estruturas simples e relativamente fáceis de observar (Berger *et al*, 2008). A flor de *Arabidopsis* é constituída por quatro sépalas, quatro pétalas, seis estames e dois carpelos (Goto, 1996) (Figura 1.4B). O desenvolvimento inicial da flor foi já descrito em 12 estádios diferentes por Smyth e colaboradores (1990) tendo em conta o tamanho das sépalas, pétalas, estames e gineceu.

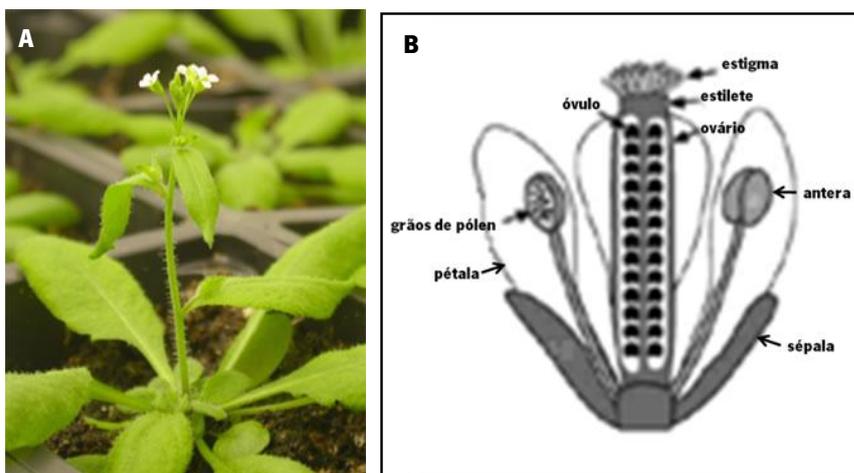


Figura 1.4 – *Arabidopsis thaliana*

A – Planta completa; B – Esquema da flor (Adaptado de Drews e Yadegari, 2002)

1.2.2.1. Expressão heteróloga de cardosinas A e B

Devido às dificuldades inerentes ao estudo das cardosinas no seu sistema nativo levaram os investigadores a procurar alternativas utilizando outras plantas como *Nicotiana tabacum* e a *Arabidopsis thaliana* como sistemas heterólogos. Estes sistemas têm-se mostrado

eficazes uma vez que têm sido obtidos resultados que podem ser elucidativos no estudo destas proteinases (Duarte *et al*, 2008; Soares da Costa, 2009).

Duarte e colaboradores (2008) utilizaram plantas de *Arabidopsis* para avaliar a expressão de cardosina A detectaram a proteína na sua forma madura (31 kDa) e intermediária (35 kDa) no vacúolo, concluindo que a cardosina A era correctamente direccionada para o vacúolo neste sistema. As plântulas de *Arabidopsis* foram utilizadas ainda noutra estudo, para testar a expressão da cardosina B, de forma a seleccionar linhas com expressão estável. Nestas plântulas, a cardosina B foi detectada na sua forma processada, apesar da forma precursora da proteína ter sido também detectada, embora em quantidades muito pequenas (Soares da Costa, 2009). Nestas plântulas de *Arabidopsis*, a cardosina B era detectada nos vacúolos e no apoplasto (Soares da Costa, 2009).

Num estudo realizado, utilizando sementes transgénicas de *Arabidopsis* transformadas com o sistema indutível, foi observada a cardosina B no citoplasma, 24h após a indução da sua expressão e esta marcação manteve-se ao longo do desenvolvimento embrionário. Neste mesmo trabalho pode-se ainda visualizar a acumulação da cardosina B na parede celular, sendo indicativo que a proteína foi reconhecida no sistema heterólogo (Oliveira, 2009).

Estes dados permitiram validar o sistema *Arabidopsis* como fiável para o estudo das cardosinas.

1.3. O sistema indutível

O sistema de expressão estável indutível LhGR (Craft *et al*, 2005) foi desenvolvido a partir do sistema LhG4, descrito por Moore e colaboradores (1998). Este sistema baseia-se no cruzamento de plantas repórter com plantas activadoras. As plantas repórter, são plantas de linhas transgénicas que possuem o gene de interesse clonado a jusante de um promotor mínimo (pOp) composto apenas por uma TATA-box por locais de ligação (operadores *lac*) para um factor activador de transcrição específico (LhG4, ausente nestas plantas). As plantas activadoras são plantas de linhas transgénicas que expressam o factor activador de transcrição quimérico LhG4, que reconhece especificamente os locais de ligação do promotor da construção repórter. O transgene de interesse pode então ser estudado nos descendentes dos cruzamentos entre as

linhas de plantas ativadoras e plantas repórter, pois é nestas que o transgene é expresso devido à presença do factor activador de transcrição quimérico (Figura 1.5) (Moore *et al*, 1998).

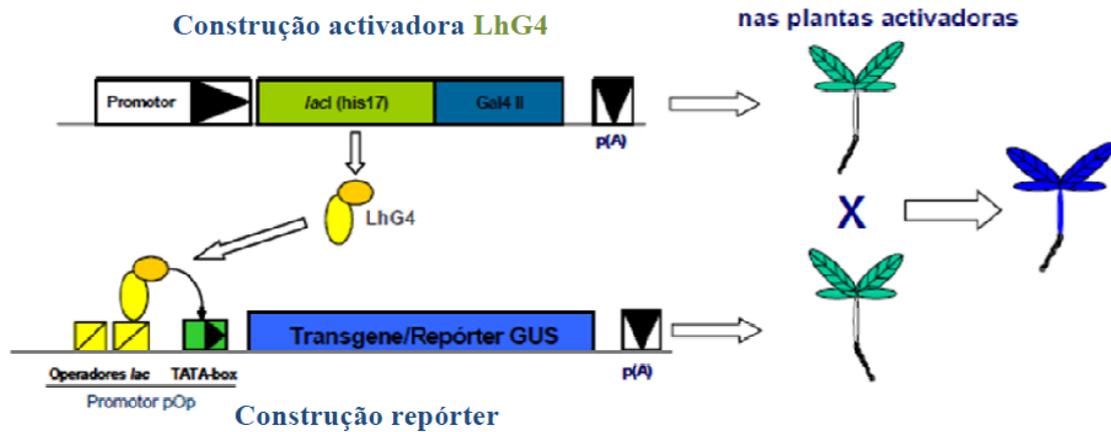


Figura 1.5 – Representação esquemática do sistema de ativação LhG4. A expressão do transgene ocorre na descendência resultante do cruzamento entre plantas ativadoras e plantas repórter (Adaptado de Moore *et al*, 1998).

O sistema LhGR surgiu a partir do sistema LhG4 mas tem a vantagem de não necessitar do cruzamento entre as plantas ativadoras e as plantas repórter para que ocorra transcrição do transgene de interesse. O construção ativador LhGR, tal como o LhG4, codifica um factor de activação de transcrição quimérico, mas ao qual foi adicionada uma sequência correspondente a um domínio de ligação para um glucocorticóide. No sistema LhGR partimos de linhas de plantas ativadoras, que possuem integrado no seu genoma a construção ativador LhGR, e que são depois transformadas com um construção repórter que inclui, no mesmo T-DNA, o gene repórter e o transgene de interesse (Craft *et al*, 2005).

Nas plantas ativadoras, antes ou depois da transformação com a construção repórter, numa situação em que não se encontre presente o glucocorticóide indutor dexametasona (Dex), o factor activador de transcrição quimérico resultante da expressão da construção ativador forma um complexo inactivo com uma chaperonina expressa constitutivamente, a *Heat shock protein 90* (Hsp90). A dexametasona, visto não existir naturalmente nas plantas, é aplicada de forma exógena e tem a capacidade de competir eficazmente com a Hsp90 na associação ao factor de activador da transcrição quimérico (Craft *et al*, 2005).

Desta forma, o complexo glucocorticóide:ativador de transcrição assume uma forma activa, ligando-se à construção repórter pelo domínio de ligação do DNA e permitindo o início da transcrição. A construção repórter permite a transcrição em duas direcções: para um lado o transgene de interesse inserido no *Multiple Cloning Site* (MCS), para o outro, o gene repórter (*GUS*) e o marcador de resistência à higromicina, que vai servir para a selecção dos transformantes estáveis (Figura 1.6).

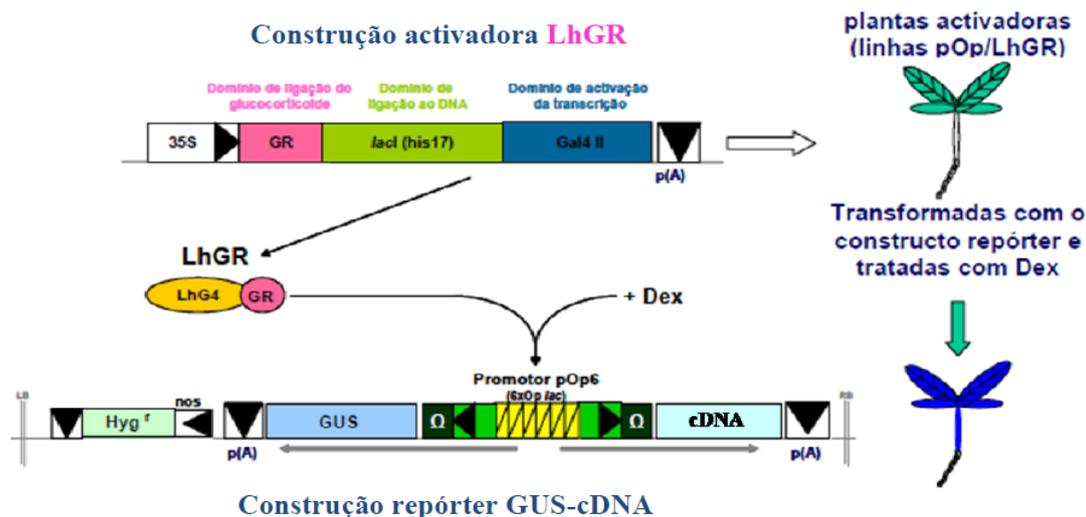


Figura 1.6 – Representação esquemática do sistema de activação de transcrição LhGR, quimicamente indutível. A construção activadora está incorporada no genoma das plantas pertencentes às linhas activadoras. A construção repórter pode ser clonada com o cDNA de interesse, e posteriormente ser clonado num vector e utilizado para gerar plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*. Neste caso, a activação do transgene está dependente da aplicação exógena do glucocorticóide dexametasona (Dex) (Adaptado de Moore *et al*, 1998).

Foram já obtidas, testadas e utilizadas plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* com expressão indutível e estável em trabalhos anteriores (Macedo, 2005; Duarte *et al*, 2008; Oliveira, 2009, Soares da Costa, 2009). Neste trabalho foram utilizadas linhas com expressão estável e indutível correspondentes às cardosinas A e B.

1.4. Objectivos

O cardo é uma planta bianual de grandes dimensões e difícil manuseamento em laboratório, por isso surgiu a necessidade de utilizar sistemas heterólogos para expressar as

proteínas de interesse. O uso destes sistemas tem vindo a ser implementado neste laboratório para estudo da biossíntese e vias de trânsito para além de possíveis inferências sobre a sua função. Nesse sentido foram utilizadas plantas de *Arabidopsis* de linhas estáveis e indutíveis transformadas com cardosina A e com cardosina B já existentes e testadas no laboratório (Duarte *et al*, 2008; Soares da Costa, 2009; Oliveira, 2009) para a realização deste trabalho.

Este trabalho poderá dividir-se em dois capítulos diferentes. Por um lado pretendia-se avaliar se a sobreexpressão/expressão ectópica das cardosinas A e B alteraria de algum modo o fenótipo das plantas transformadas. Este objectivo inclui uma caracterização fenotípica das linhas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, para comparação das plantas induzidas das linhas transformadas com cardosina A e B com plantas *wild type* e plantas não induzidas e, ainda, a análise anatómica por microscopia óptica.

Por outro lado, utilizou-se a *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo, já que se pretendia caracterizar o padrão espacial e temporal da expressão das cardosinas A e B nas flores. O estudo da localização tecidual e intracelular é importante na medida em que serve de ponto de partida para o estudo das cardosinas, quer das suas possíveis funções, quer das vias de trânsito seguidas por estas proteínas. Neste caso, utilizando a planta *Arabidopsis* como sistema heterólogo é possível uma comparação da localização das cardosinas com o sistema nativo de modo a inferir quais os possíveis trabalhos posteriores que poderão ser realizados de forma a resolver as problemáticas relacionadas com o estudo das cardosinas.

Para estas análises seleccionou-se uma abordagem correntemente utilizada em análises funcionais de genes, que inclui a produção de construções quiméricas para expressão ectópica, constitutiva ou indutível em plantas transgénicas, o que permite estudos do seu impacto em processos biológicos, análise fenotípica, localização subcelular, etc. A análise da localização subcelular de uma proteína quimérica pode permitir inferências poderosas acerca da função do respectivo gene, o impacto observável nas células e tecidos onde se expressa e correlação com as alterações funcionais a que conduz.

A expressão ectópica para eventual estudo de ganho de função e análise fenotípica é classicamente obtida colocando o gene sob controlo de um promotor constitutivo.

Contudo, esta expressão de genes pode ter efeitos como esterilidade ou letalidade, o que levou à utilização de métodos que permitem a regulação temporal da expressão incluindo promotores sensíveis a choque térmico ou sistemas de expressão quimicamente indutível (Moore *et al*, 2006).

Estes promotores permitem estudar a actividade dos genes em fases específicas do desenvolvimento da planta.

Aproveitando o sistema quimicamente indutível usado neste laboratório, pretendia testar-se os efeitos da indução por dexametasona em dois pontos específicos do desenvolvimento: desde a imbibição da semente e aquando do aparecimento das hastes.

Nas construções usadas, um promotor bidireccional mínimo pOp6 dirige a expressão simultaneamente, em direcções opostas, do transgene de interesse e do gene repórter da β -glucuronidase (*GUS*).

Deste modo proceder-se-á à realização de uma coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter *GUS* nas flores permitindo verificar se as construções estão a ser expressas nas plantas transgénicas e fazer uma primeira avaliação da distribuição espacial da expressão na planta

A localização da expressão dos genes de interesse tem sido feita neste laboratório por meio de duas abordagens: através da expressão de construções de fusões com genes repórter e através de imunofluorescência utilizando anticorpos específicos já previamente testados neste laboratório.

Apesar das vantagens inerentes à utilização de fusões com genes repórter, nomeadamente a possibilidade de observar a localização das proteínas *in vivo*, a localização por técnicas imunológicas evita os efeitos possíveis da interferência da proteína repórter no padrão de expressão, permitindo aferir, por comparação a sua fiabilidade.

Neste trabalho a abordagem a utilizar é a localização das cardosinas por imunocitoquímica, utilizando anticorpos primários específicos e anticorpos secundários conjugados com fluorocromos. A observação é efectuada com recurso a microscópio clássico de fluorescência e a técnicas avançadas de microscopia confocal.

A localização da expressão a nível ultraestrutural, com elevada resolução, permitirá ainda analisar a localização nos compartimentos subcelulares, um dado imprescindível para futuros estudos de trânsito intracelular destas proteínas.

2. Material e Métodos

O material biológico utilizado em todas experiências foram flores provenientes de *Arabidopsis thaliana* nas fases fechada e aberta (considerando que esta fase se inicia quando já é possível distinguir as pétalas).

Material Biológico:

Para a obtenção do material biológico foram esterilizadas sementes provenientes de linhas estáveis de *Arabidopsis thaliana* com expressão indutível em 500 µL de Etanol 70% (v/v) durante 5 minutos num tubo de 1,5 mL com agitação. Na câmara de fluxo laminar transferiram-se as sementes para um papel de filtro juntamente com o Etanol e deixaram-se a secar. Depois de secas, colocaram-se as sementes em placas de Petri contendo meio MS (Murashige e Skoog) suplementado com sacarose 1,5% (p/v) e bactoagar 0,7% (p/v). Utilizou-se Higromicina (15 µg/mL) para seleccionar as plantas resistentes, dado se terem utilizado linhas heterozigóticas. Estas placas foram colocadas a 4°C durante 2 dias, para promover a vernalização, na obscuridade (devido à sensibilidade da Higromicina à luz). Após vernalização colocaram-se as placas numa câmara de crescimento com uma temperatura de 23°C e com um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de obscuridade cerca de 15 dias até as plantas possuírem 4 a 5 folhas. Neste ponto transferiram-se as plantas para substrato vegetal. De modo a induzir a expressão das cardosinas A e B regaram-se as plantas com Dexametasona (Dex – preparado em DMSO) a 20 µM. Nas plantas em que se pretendia uma indução desde o início da germinação adicionou-se de Dex ao meio MS utilizado para germinar as sementes.

Caracterização do desenvolvimento das linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

A preparação do material biológico para a caracterização fenotípica foi realizada como descrito anteriormente, apenas com algumas excepções. No caso das plantas induzidas desde a germinação, o meio de continha Dex a 20 µM e as plantas foram mantidas sempre com a adição de Dex durante a experiência. Como controlo foram utilizadas plantas *wild type* e plantas transformadas. No caso das plantas *wild type* não se adicionou Higromicina ao meio. As plantas controlo foram mantidas com DMSO 1% (v/v) desde a germinação. De modo a se poderem medir as raízes colocaram-se as placas de Petri na vertical e adquiriram-se as imagens à lupa

Nikon SMZ – U DIA STAND com o auxílio de uma câmara Nikon Digital Camera DXM1200F e do software Nikon ACT1. Após se transferirem as plantas para substrato vegetal não se mediram mais as raízes.

Processamento do material biológico para imunofluorescência

Foram recolhidas flores fechadas e abertas de *Arabidopsis thaliana* e processadas separadamente. As flores foram fixadas em Paraformaldeído a 3% (v/v) em PBS 1x (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂PO₄, 1,5 mM K₂PO₄·2H₂O. pH 7,3) à temperatura ambiente durante 90 minutos. O material foi sujeito, posteriormente a uma série de 5 lavagens em PBS 1x durante 10 minutos cada. Seguiu-se a desidratação numa série crescente de Etanol durante 30 minutos cada à temperatura ambiente – 30% (v/v), 50% (v/v), 70% (v/v), 90% (v/v) e 3x 100% (v/v). A primeira passagem com Etanol foi mantida ON (*overnight*) ou OW (*overweekend*). Aquando da última passagem em Etanol 100%, o material apenas esteve 20 minutos à temperatura ambiente, tendo sido colocado a 42°C, em banho-maria nos restantes 10 minutos. Terminado este tempo foi adicionado um volume igual de PEG (90g de PEG e 10g de Hexadecanol, misturados a 65°C) ao último de Etanol, deixando-se a 42°C ON. Procedeu-se à substituição da mistura de Etanol e PEG por 2 mL de PEG, permanecendo a 42°C durante pelo menos 4 horas. Findo esse tempo, prepararam-se os blocos contendo o material a analisar utilizando-se moldes próprios. A polimerização ocorreu à temperatura ambiente ON, guardando-se posteriormente os blocos a 4°C.

Preparação de lâminas revestidas com Poli – L – Lisina

De modo a desengordurar e limpar, mergulharam-se lâminas de vidro numa solução com detergente durante 5 minutos, lavando abundantemente de seguida com água destilada para remoção do detergente. Mergulharam-se depois as lâminas em Etanol a 70% (v/v) durante 5 minutos. Substituiu-se esta solução por uma de Poli – L – Lisina 0,1% (p/v) durante 10 minutos. Secaram-se as lâminas numa estufa a 37°C ON ao abrigo de poeiras.

Imunofluorescência

Foram obtidos cortes de 14 µm num micrótomo de parafina Spencer “820” Microtome (American Optical Company, CAT 822) que foram posteriormente recolhidos para uma lâmina revestida com Poli-L-Lisina contendo 750 µL de PBS 1x. As lâminas foram bem secas ao ar para permitir uma aderência dos cortes às mesmas e colocadas posteriormente a 4°C ON. Procedeu-se à re-hidratação dos tecidos, promovendo a remoção do PEG, numa série decrescente de Etanol diluído em PBS 1x, durante 10 minutos cada à temperatura ambiente – 3x 100% (v/v), 90% (v/v), 70% (v/v), 50% (v/v) e 30% (v/v). Seguiram-se duas lavagens em PBS 1x durante 10 minutos cada. Após as lavagens, realizou-se o bloqueio em BSA 100 mg/10 mL (em PBS 1x) durante 15 minutos. Incubaram-se as lâminas em câmara húmida a 26°C durante 1 hora com o anticorpo primário diluído em PBS 1x. Foram utilizados anticorpos anti-cardosina A (anti-A) numa diluição de 1:200, e anti-cardosina B (anti-B) numa diluição de 1:120. Após a incubação com o anticorpo primário sucederam-se cinco lavagens em PBS 1x com gelatina de peixe 1% (v/v) durante 10 minutos cada. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, USA) numa diluição de 1:80 à temperatura ambiente durante 1 hora, na obscuridade. Procedeu-se a duas lavagens em PBS 1x com gelatina de peixe 1% (v/v) durante 10 minutos cada. Por fim, retirou-se o excesso de líquido, colocou-se 5 - 7 µL (por lâmina) de CitiFluor sobre os cortes e, posteriormente, a lamela. As preparações foram seladas com verniz e guardadas na obscuridade a 4°C. As mesmas foram observadas recorrendo a um microscópio de varrimento confocal a laser (CLSM) modelo Leica TSP SP2 (Leica Microsystems, Alemanha) com um comprimento de onda de excitação de 488 nm. O processamento e análise de imagem foi realizado utilizando o programa informático Leica Confocal Software, versão 2.61 Build 1538 – LSC Lite (Leica Microsystems, Alemanha).

Processamento do material biológico para microscopia electrónica

Tal como anteriormente foram recolhidas flores fechadas e abertas de *Arabidopsis thaliana*. Neste caso a fixação do material foi feita durante 2 horas com Paraformaldeído a 3% (v/v), Glutaraldeído a 0,5% (v/v) e sacarose 1% (p/v) em tampão cacodilato 0,1M com pH 6,8. Seguiram-se três lavagens em tampão cacodilato 0,1M, pH 6,8, durante 10 minutos cada.

Procedeu-se de seguida à desidratação do material numa série crescente de Etanol – 10% (v/v) durante 10 minutos à temperatura ambiente, 20% (v/v) ON à temperatura ambiente, 30 % (v/v) e 50% (v/v) durante 30 minutos a 4°C cada, 70% (v/v) durante 20 minutos a -20°C, 90% (v/v) e 2x 100% (v/v) durante 30 minutos a -20°C cada. A inclusão do material foi sempre realizada a -20°C, e foi iniciada com Etanol a 100% (v/v) e 10% de LRWhite durante uma hora. Findo esse tempo foram-se adicionando gotas de LRWhite de modo gradual até ficar numa razão de 50%:50% (v/v) durante a noite. Substitui-se por LRWhite puro, durante o dia, voltando-se a substituir à noite por LRWhite puro permanecendo assim ON. Posteriormente realizou-se a inclusão em cápsulas de gelatina, deixando a polimerizar numa estufa a 55°C ON. Os blocos foram guardados à temperatura ambiente com sílica para manter o ambiente seco.

Imunocitoquímica

Obtiveram-se cortes ultra-finos utilizando um ultramicrotomo modelo Leica Reichert Supernova e recolheram-se os cortes para grelhas níquel. Todo o material utilizado foi previamente lavado com acetona de modo a ficar limpo e desprovido de gorduras. Incubaram-se as grelhas em TBS 1x com Tween20 1% (v/v) durante 10 minutos, passaram-se posteriormente as grelhas para a solução bloqueio, constituída por TBS 1x com goat serum 1% (v/v) e glicina a 100 mM, durante 10 minutos. A incubação com anticorpo primário foi feita de seguida durante uma hora em TBS 1x com goat serum 1% (v/v) e glicina a 100 mM. Foram utilizados anticorpos anti-cardosina A (anti-Ab) numa diluição de 1:200, e anti-cardosina B (anti-Ba) numa diluição de 1:50. Seguiram-se 5 lavagens em TBS 1x. Após as lavagens as grelhas foram novamente incubadas em TBS 1x com goat serum 1% (v/v) e glicina 100 mM durante 10 minutos. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal (10 nm gold labelled goat anti-rabbit IgG (H+L), GE Healthcare, UK) numa diluição de 1:20 durante 1 hora. Procedeu-se então a 5 lavagens em TBS 1x, seguidas de 5 lavagens com água destilada estéril. A contrastação foi realizada em acetato de uranilo 2% (v/v) durante 5 minutos, lavaram-se as grelhas por água destilada 5x, e por fim em citrato de chumbo durante 1 minuto. Posteriormente visualizaram-se as grelhas num microscópio electrónico de transmissão Zeiss modelo EM 10 C.

Coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter *GUS* nas flores

Colocaram-se flores abertas e fechadas de linhas transgênicas de cardosina A e decardosina B, induzidas com Dex e não induzidas, em tubos de 1,5 mL. Incubaram-se os tubos em câmara húmida, durante 4 horas, a 37 °C em tampão de coloração de GUS [tampão fosfato 100 mM pH = 7,0, Tris-HCl 10 mM, pH = 8,0, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,05 % (v/v) e 1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dglucuronido (X-Gluc, previamente dissolvido em 10 μ L de dimetilformamida – DMF; Melford Laboratories)]. Removeu-se a solução de coloração GUS e adicionou-se 250 μ L de Etanol a 70% (v/v), incubando-se de seguida a 42 °C durante 30 minutos de modo a se remover as clorofilas presentes nas amostras. Substituiu-se o Etanol a 70% (v/v) por novo Etanol a 70% (v/v) e incubou-se os tubos à temperatura ambiente durante 16 horas. A aquisição de imagens foi feita numa lâmina onde se colocaram os exemplares, observando-se os mesmos num microscópio de epifluorescência Nikon Optiphot-2 (Japão), e fotografou-se com o auxílio de uma câmara Nikon Digital Camera DXM1200F. A actividade de GUS foi revelada pela formação de um precipitado de cor azul, resultante da metabolização do substrato X-Gluc.

3. Resultados

3.1. Caracterização fenotípica das linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. Ensaio preliminar

De forma a avaliar o efeito que a expressão heteróloga das cardosinas A e B poderiam ter no desenvolvimento das plantas de *Arabidopsis* avaliaram-se vários parâmetros durante o seu crescimento. Foram utilizadas plantas pertencentes a linhas transgênicas de *Arabidopsis* com expressão indutível e estável de cardosina A e cardosina B. As plantas foram regadas com Dex diluído em água de modo a induzir a expressão de cardosina A e cardosina B nas respectivas linhas. Realizou-se um ensaio primário onde se mediram as raízes (ao longo do desenvolvimento das plantas), tendo em conta a zona pilosa, assim como o número de raízes laterais. Mediu-se também o tamanho dos cotilédones, das siliquas e a altura das hastes florais. Contabilizou-se também o número de flores, hastes florais principais e siliquas. Neste primeiro ensaio as plantas não induzidas foram regadas com água. O comprimento das raízes, comprimento da zona pilosa e número de raízes laterais foram medidos, após vernalização, apenas até ao 14º dia (com 3 a 4 dias de intervalo), ou seja, enquanto as plântulas se encontravam na placa de Petri. Após esse período transferiram-se as plântulas para substrato sólido, não sendo, por isso, possível avaliar estes parâmetros. A partir do 14º dia, os restantes parâmetros foram avaliados a cada 7 dias com as plantas em substrato sólido, até ao 43º dia em que se finalizou o trabalho.

3.1.1.1. Comprimento da raiz principal

Em relação ao parâmetro respeitante ao comprimento da raiz principal, nas plantas *wild type*, pôde-se verificar um crescimento gradual até ao 10º dia, onde as raízes apresentavam em média de 27,8 mm. A partir deste dia observou-se um crescimento mais acentuado até ao 14º dia, onde as raízes apresentaram em média 65,1 mm (Figura 3.1).

O crescimento das raízes das plantas das linhas que continham a construção que codifica a cardosina A foi semelhante entre as plantas induzidas (A+) e não induzidas (A-) e também entre ambas e as plantas *wild type*, embora nas linhas transgênicas o crescimento fosse mais ténue. Observou-se portanto, um crescimento gradual até ao 10º dia, a partir do qual o crescimento se tornou mais acentuado, atingindo em média 56,9 mm nas plantas induzidas e em média 49,9 mm nas plantas não induzidas (Figura 3.1A).

Tal como no caso das plantas da linha de cardosina A, nas plantas que continham a construção que codifica a cardosina B induzidas (B+) e não induzidas (B-) mantiveram um crescimento semelhante entre si, e entre ambas e as plantas *wild type*, embora nas plantas *wild type* o crescimento tenha sido mais acentuado. Verificou-se então, um crescimento gradual até ao 10º dia, a partir deste dia o crescimento tornou-se mais acentuado até ao 14º dia, onde as raízes atingiram em média 54,2 mm e 44,3 mm nas plantas induzidas e não induzidas, respectivamente (Figura 3.1B).

Num terceiro gráfico compararam-se apenas as plantas induzidas de ambas as construções (que codificam a cardosina A e B) e as plantas *wild type*. Através da análise desse mesmo gráfico é possível comprovar-se a semelhança de comportamento no crescimento das raízes principais das plantas induzidas de ambas as construções e as plantas *wild type*, sendo notório o crescimento mais acentuado nas plantas *wild type*. No entanto, a diferença entre ambas as construções não é muito relevante (Figura 3.1C).

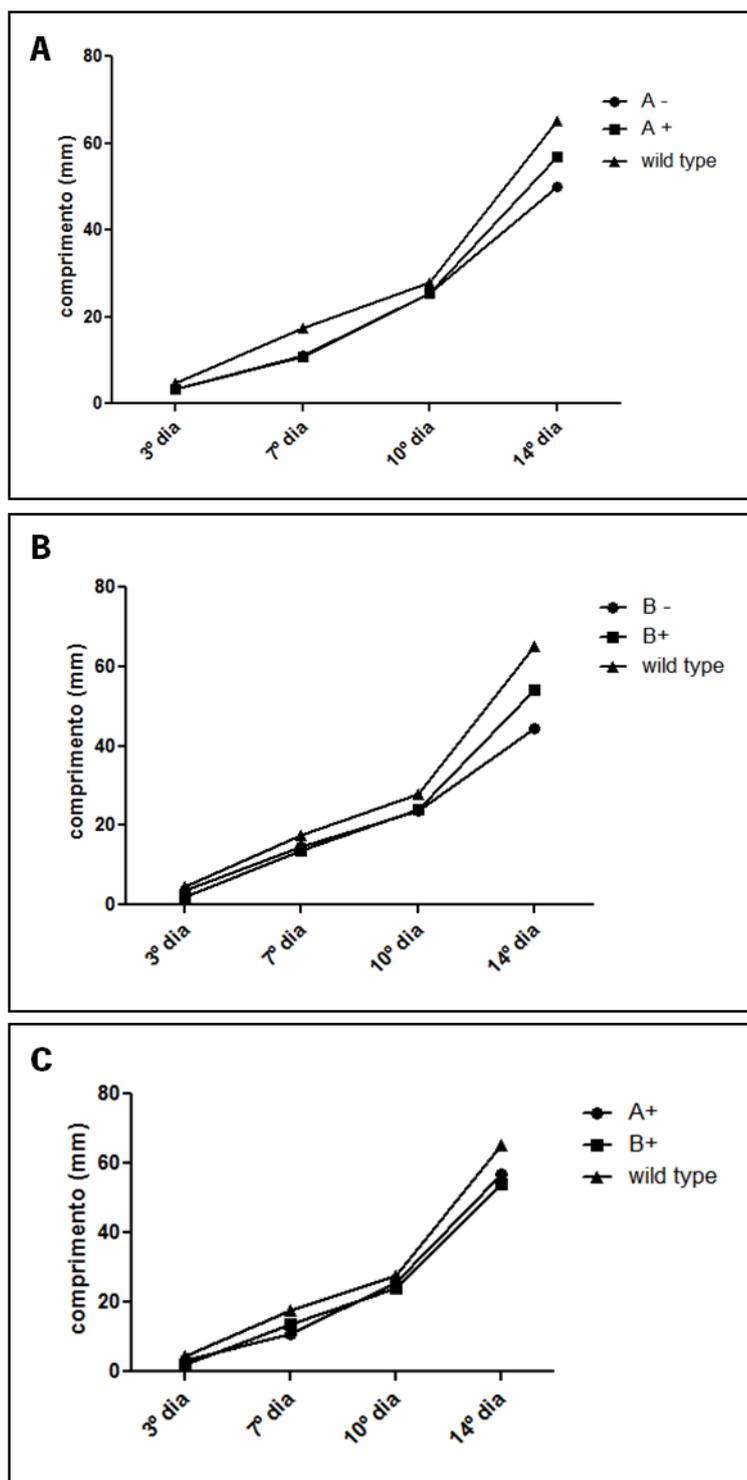


Figura 3.1 – Comparação do comprimento das raízes principais de plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Comprimento das raízes principais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Comprimento das raízes principais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o comprimento de raízes principais de plântulas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 12-26 plântulas.

3.1.1.2. Comprimento da zona pilosa das raízes principais

No que respeita ao comprimento da zona pilosa da raiz principal, nas plantas *wild type*, pôde-se verificar um crescimento gradual até ao 10º dia, onde as raízes apresentavam em média 23,9 mm. A partir deste dia observou-se um crescimento mais acentuado até ao 14º dia, onde as raízes apresentavam em média 60,2 mm (Figura 3.2).

Nas plantas que continham a construção que codifica para a cardosina A induzidas (A+) e não induzidas (A-) observou-se um aumento gradual do comprimento da zona pilosa até ao 10º dia onde a zona pilosa apresentava uma média de 14 mm, continuando a aumentar até ao 14º dia onde a zona pilosa atingiu uma média de 40,8 mm. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (A-) verificou-se um aumento gradual da zona pilosa ao longo do tempo atingindo uma média de 30,5 mm no 14º dia (Figura 3.2A).

As plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina B induzidas (B+) e não induzidas (B-) mantiveram um crescimento semelhante entre si, e entre ambas e as plantas *wild type*, embora nas plantas *wild type* o crescimento tenha sido mais acentuado. Verificou-se então, um crescimento gradual até ao 10º dia, a partir deste dia o crescimento tornou-se mais acentuado até ao 14º dia, onde o tamanho da zona pilosa das raízes atingiu em média 45,4 mm e 34,3 mm nas plantas induzidas e não induzidas, respectivamente (Figura 3.2B).

Num terceiro gráfico compararam-se apenas as plantas induzidas de ambas as construções (que codificam a cardosina A e B) e as plantas *wild type*. Através da análise desse mesmo gráfico é possível comprovar-se a semelhança de comportamento no crescimento das raízes principais das plantas induzidas de ambas as construções e as plantas *wild type*, sendo notório o crescimento mais acentuado nas plantas *wild type*. No entanto, a diferença entre ambos as construções não é muito relevante, tal como era de esperar tendo em conta o tamanho total das raízes principais (Figura 3.2C).

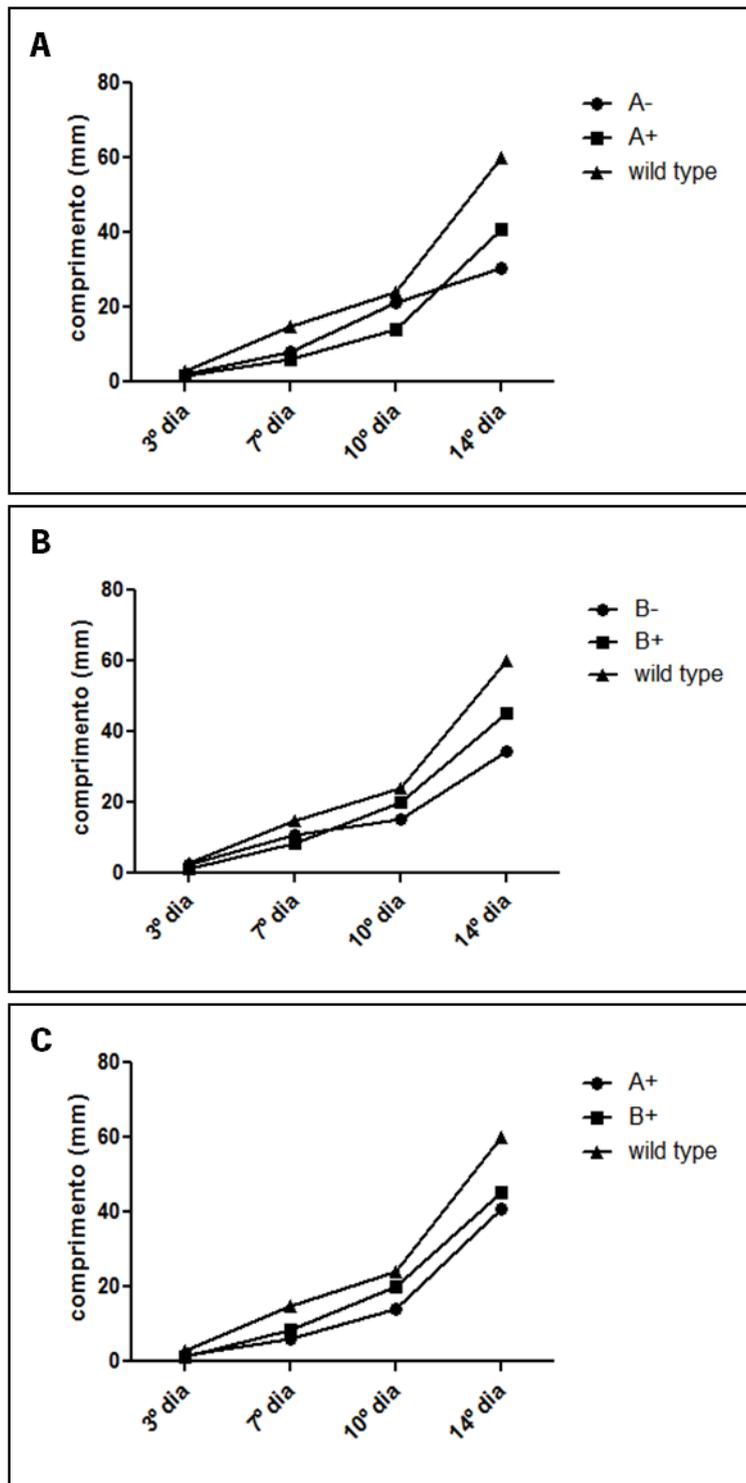


Figura 3.2 – Comparação do comprimento da zona pilosa das raízes principais das plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Comprimento da zona pilosa das raízes principais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Comprimento da zona pilosa das raízes principais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o comprimento da zona pilosa das raízes principais de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 12-26 plântulas.

3.1.1.3. Número de raízes laterais

Relativamente ao número de raízes laterais, até ao 3º dia não há registo de raízes laterais em qualquer planta. Desde o 3º dia até ao 7º dia, as plantas *wild type* apresentam um ligeiro aumento do número de raízes laterais até uma média de 4,8 raízes laterais. A partir do 7º dia o aumento do número de raízes laterais nestas plantas acontece de forma exponencial até ao 14º dia. Neste dia, as plantas *wild type* apresentam uma média de 40,2 raízes laterais (Figura 3.3).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina A, o número de raízes laterais manteve-se semelhante entre as plantas induzidas (A+) e não induzidas (A-) até ao 14º dia. Em ambos os grupos de plantas, desde o 3º dia até ao 10º dia a média de raízes laterais nas plantas foi aumentando de forma gradual, aumentando de seguida de forma exponencial até ao 14º dia, em que a média de raízes laterais era de 25,5 para as plantas A+ e 24,1 para as plantas A- (Figura 3.3A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina B, o número de raízes laterais foi aumentando de forma gradual e semelhante entre as plantas induzidas (B+) e não induzidas (B-) até ao 10º dia, a partir do qual ambos os grupos de plantas apresentaram um aumento exponencial no número de raízes laterais. No 14º dia, o número de raízes laterais era maior nas plantas induzidas em relação às não induzidas sendo em média 28,8 e 22,7 respectivamente (Figura 3.3B).

Comparou-se as plantas induzidas de ambas as construções (que codificam a cardosina A e B) e as plantas *wild type* e foi possível constatar-se que a partir do 3º dia, as plantas *wild type* possuíam sempre maior número de raízes laterais. O número de raízes laterais nas plantas com as construções que codificam para a cardosina A e B foi semelhante até ao 10º dia, a partir do qual se verificou uma ligeira diferença no número de raízes laterais entre as plantas de ambos os construções, em que as plantas com a construção que codificava a cardosina B apresentavam um maior número de raízes laterais em relação às plantas que continham a construção que codifica a cardosina A (Figura 3.3C).

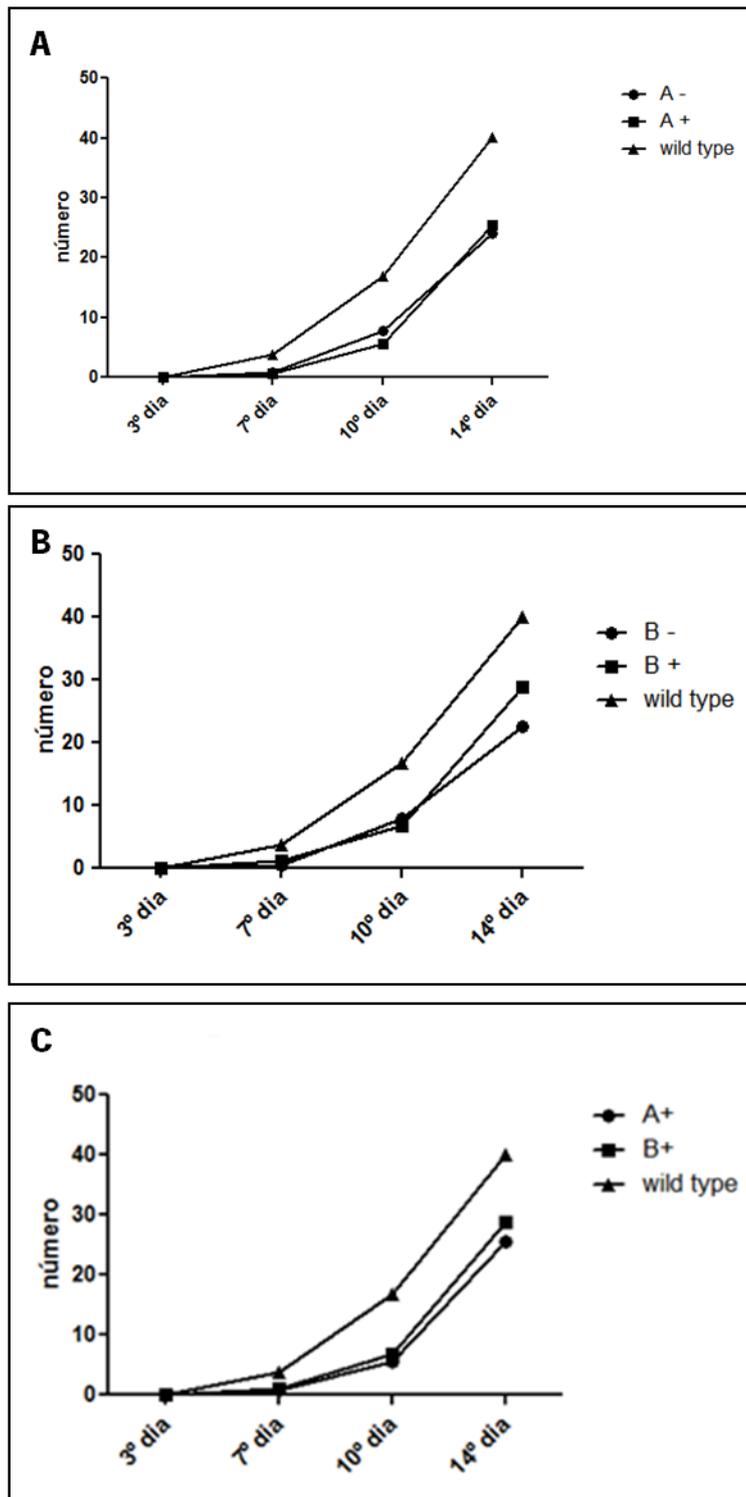


Figura 3.3 – Comparação do número de raízes laterais de plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de raízes laterais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de raízes laterais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de raízes laterais de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 12-26 plântulas.

3.1.1.4. Cotilédones

Os cotilédones foram medidos a partir do 3º dia até ao 10º dia, após o qual já não foi possível verificar o tamanho dos cotilédones dado que estes senescem. Nas plantas *wild type*, tal como nas restantes plantas testadas pôde-se verificar um aumento linear do tamanho dos cotilédones entre o 3º e o 10º dia, observando-se uma média de 3,1 cm (Figura 3.4).

Nas plantas que continham a construção que codifica para a cardosina A induzidas (A+) e não induzidas (A-) observou-se uma média de 2,9 cm e 2,8 cm ao 10º dia, respectivamente (Figura 3.4A).

Nas plantas que continham a construção que codifica para a cardosina A induzidas (B+) e não induzidas (B-) observou-se uma média de 2,5 cm e 2,6 cm ao 10º dia, respectivamente (Figura 3.4B).

Embora o crescimento entre os diferentes grupos de plantas tenha sido semelhante, pode-se verificar que o crescimento dos cotilédones foi menor nas plantas nas plantas transformadas com a construção B, e maior nas plantas *wild type* (Figura 3.4C).

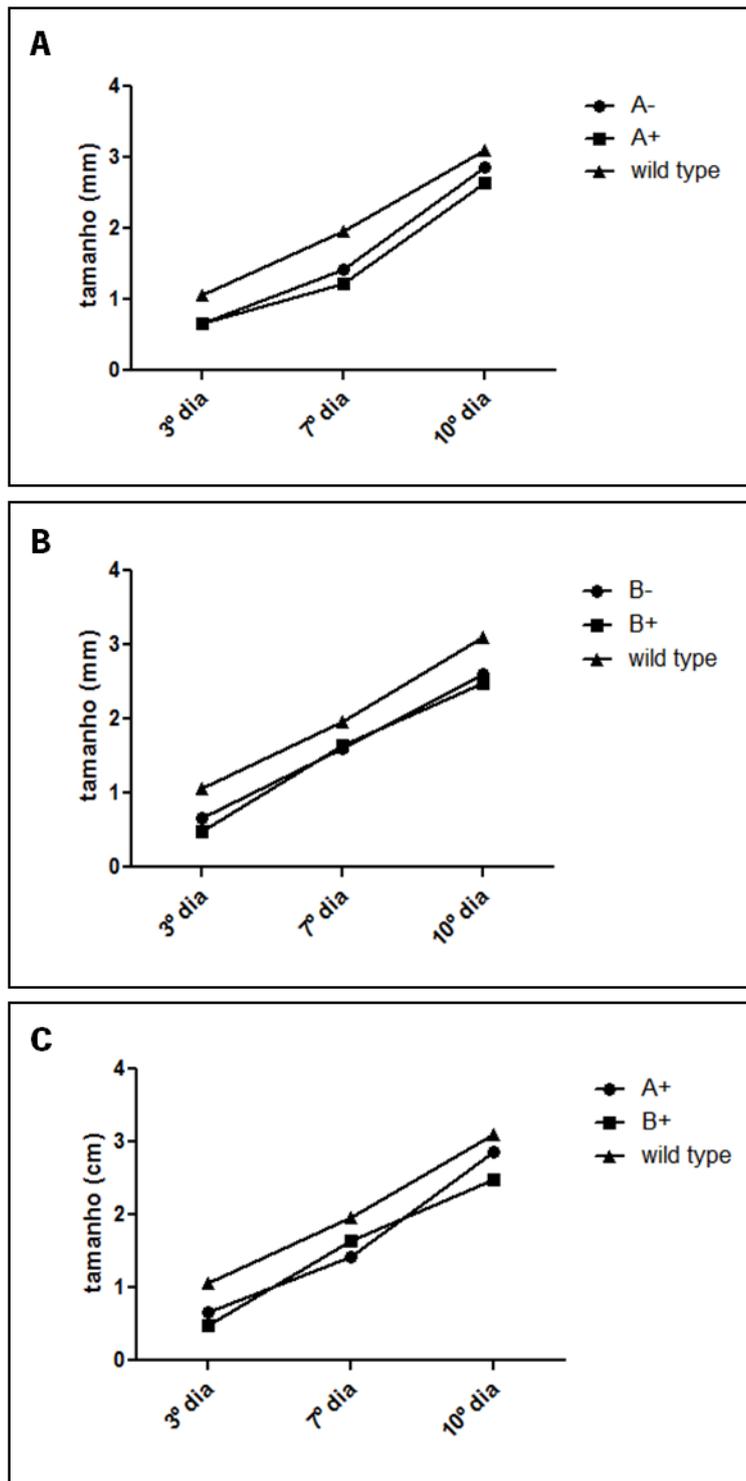


Figura 3.4 – Comparação do tamanho dos cotilédones de plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Tamanho dos cotilédones de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Tamanho dos cotilédones de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o tamanho dos cotilédones de plântulas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 12-26 plântulas.

3.1.1.5. Número de hastes principais

O número de hastes principais começou a ser contabilizado a partir do 14º dia quando se passaram as plantas para substrato sólido, no entanto, o aparecimento de hastes observou-se no 21º dia em algumas plantas. Nas plantas *wild type*, no 21º dia, o número médio de raízes ainda não chegava a 1. A partir deste dia, o número de hastes florais foi aumentando gradualmente até ao 35º dia, onde estabilizou, havendo 2,9 hastes em média por planta (Figura 3.5).

O número de hastes principais nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A, nas plantas induzidas (A+) tal como nas *wild type* começa por aumentar gradualmente até ao 35º dia, no qual atinge uma média de 2 hastes principais. A partir deste dia, o número de hastes principais manteve-se até ao 43º dia. Nas plantas não induzidas transformadas com a mesma construção (A-), o número de hastes principais era menor que nas plantas induzidas até ao 35º dia, aumentando gradualmente até ao mesmo, sendo que no 35º dia o número médio de hastes principais era de 1 por planta. A partir deste dia, até ao 43º, o número de hastes principais aumentou significativamente até à média de 2,3 por planta (Figura 3.5A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina B, o número de hastes principais aumentou, nas plantas induzidas (B+), até ao 35º até uma média de 2 hastes principais, a partir do qual o número médio de hastes principais ficou estável neste grupo de plantas. Nas plantas não induzidas (B-) não se registou o aparecimento de hastes principais até ao 21º dia. No entanto, entre o 21º dia e o 28º dia houve um aumento significativo de hastes principais neste grupo de plantas, em que foi atingida uma média de 2,3 hastes principais. Entre o 28º dia e o 35º dia, o número de hastes principais manteve-se estável, aumentando ligeiramente de seguida até ao 43º dia, quando as plantas possuíam em média 2,7 hastes (Figura 3.5B).

Comparando as plantas transformadas com ambas as construções induzidas (A+ e B+) pode-se verificar uma ligeira convergência no número de hastes principais desde o 21º dia até ao 43º dia. Também é possível se verificar que nas plantas *wild type* o número de hastes principais é, em média, maior desde o 28º dia até ao 43º em relação às plantas de ambas as construções induzidas (Figura 3.5C).

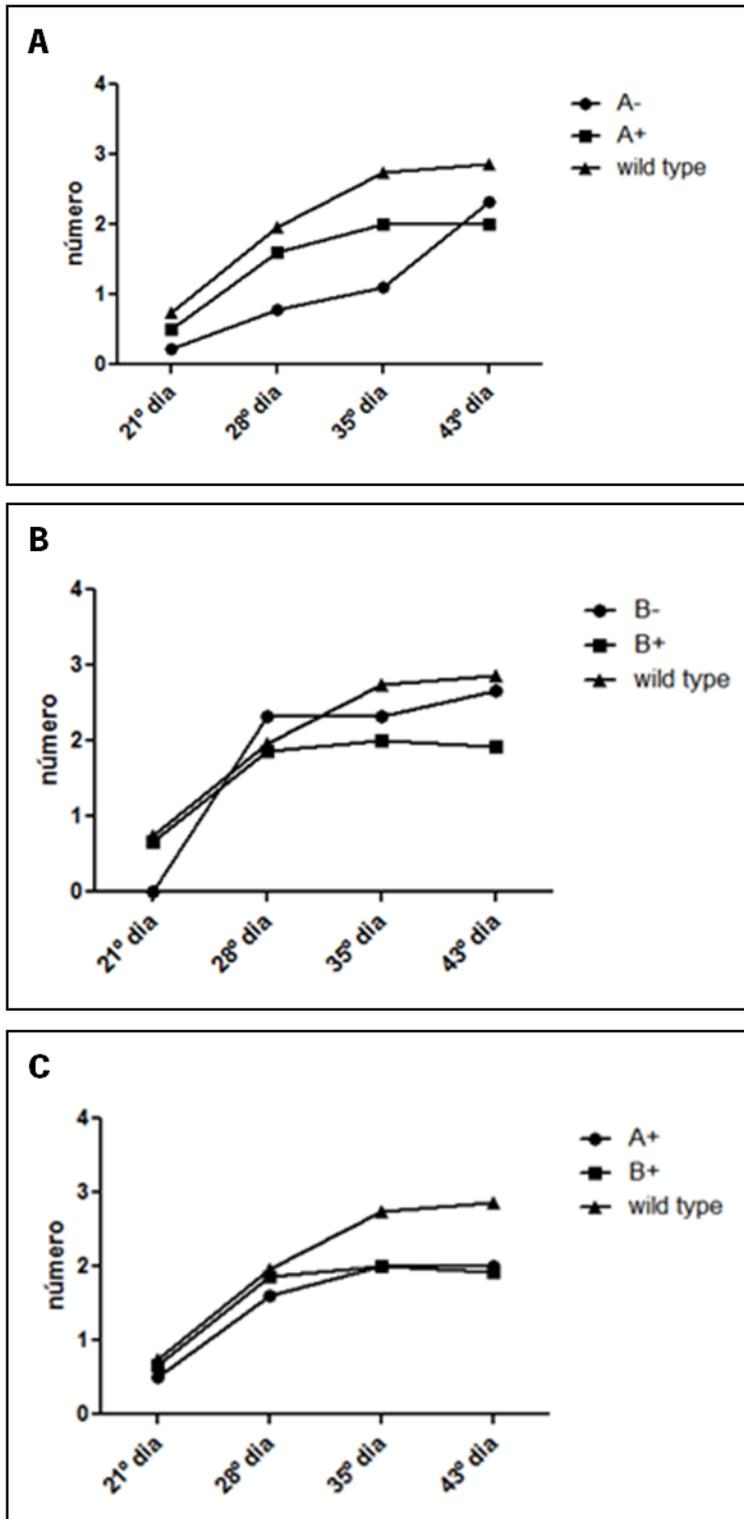


Figura 3.5 – Comparação do número de hastes principais de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de hastes principais de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de hastes principais de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de hastes principais de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 3-23 plantas.

3.1.1.6. Altura das hastes florais

A altura das hastes florais foi medida tendo em conta as hastes principais das plantas. Assim, no caso das plantas *wild type* o crescimento das hastes florais foi gradual até ao 43º dia, quando as hastes florais mediam em média 24,3 cm (Figura 3.6).

O crescimento das hastes florais das plantas das linhas que continham a construção que codifica a cardosina A foi semelhante entre as plantas induzidas (A+) e não induzidas (A-), crescendo ambas, de forma gradual, tal como as hastes florais das plantas *wild type*, atingindo em média 19,2 cm de altura ao 43º dia (Figura 3.6A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina B nas plantas induzidas (B+), o crescimento das hastes florais foi gradual até ao 35º dia, abrandando de seguida até ao 43º dia em que foram atingidos em média 16,4 cm de altura. Nas plantas não induzidas transformadas com a mesma construção (B-), as hastes florais tiveram um crescimento ténue entre o 21º dia e o 28º dia até uma média de 1,7 cm. A partir do 28º dia, esse crescimento foi mais acentuado até ao 43º dia, em que atingiu uma média de 19,4 cm de altura, atingindo portanto, um valor maior que nas plantas induzidas em que a média da altura das hastes florais foi de 16,4 cm (Figura 3.6B).

Comparando o crescimento das hastes florais nas plantas *wild type* e de ambas as construções induzidas (A+ e B+) pode-se verificar que as plantas *wild type* foram as que mais cresceram. Nas plantas A+, as hastes florais possuíam em média uma maior altura até ao 35º dia, em relação às B+, a partir do qual nas plantas A+ o crescimento das hastes florais abrandou tendo continuado nas plantas B+, motivo pelo qual no 43º dia, a altura das hastes florais nas plantas B+ era maior que nas A+ (Figura 3.6C).

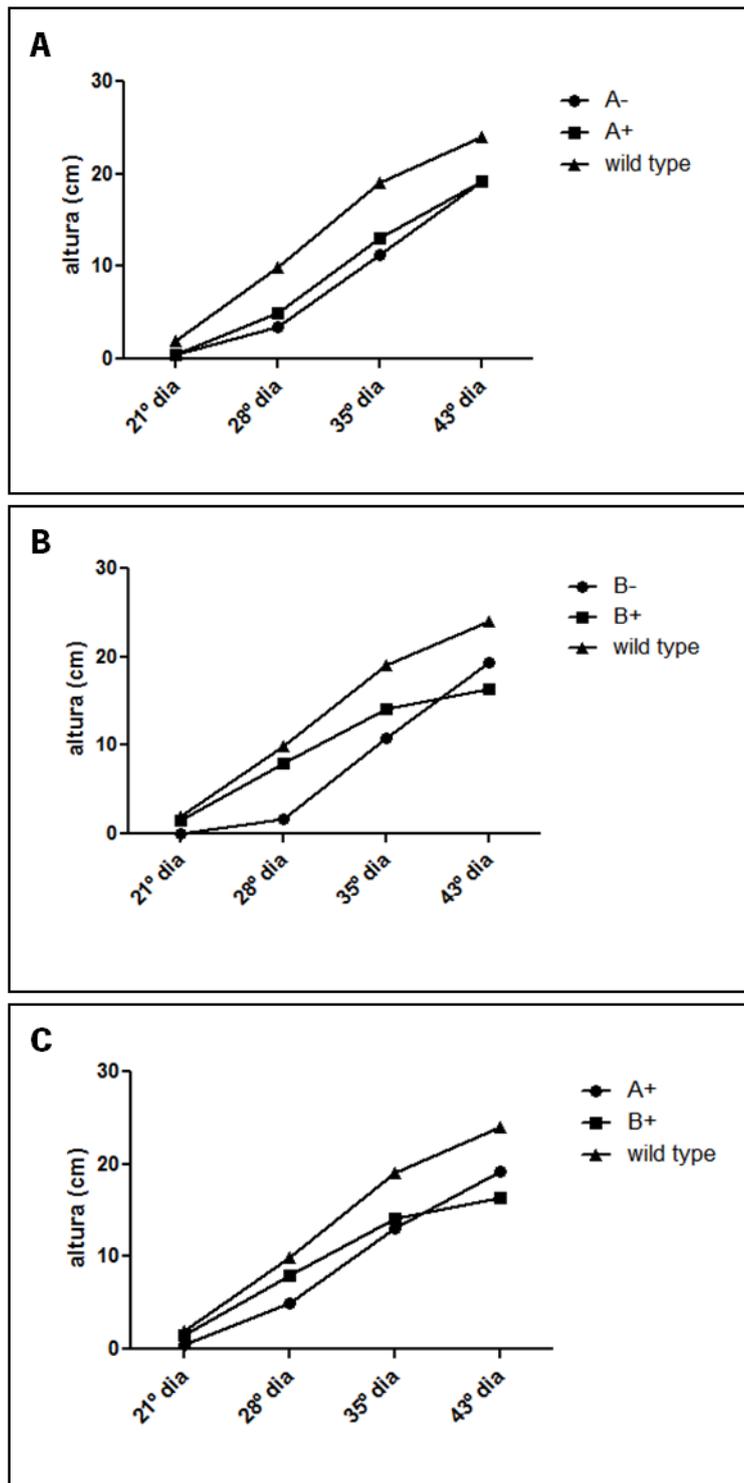


Figura 3.6 – Comparação da altura das hastes florais de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Altura das hastes florais de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Altura das hastes florais de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre a altura das hastes florais de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 3-23 plantas.

3.1.1.7. Número de flores

Tal como nas hastes florais, o número de flores começou a ser contabilizado a partir do 21º dia, ou seja após se transferirem as plantas para substrato sólido, que corresponde ao período em que começam a surgir as hastes florais.

As plantas *wild type* apresentaram desde cedo um maior número de flores que as plantas transgênicas, aumentando de forma acentuada desde o 21º dia até ao 35º dia quando se podiam contabilizar uma média de 35,9 flores. A partir deste dia, o número de flores começou a decrescer, correspondendo ao aumento do número de siliquas (Figura 3.7).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina A induzidas (A+), as flores apenas começaram a aparecer após o 21º dia, o aumento do número de flores foi gradual até ao 35º dia quando apresentavam uma média de 23,9 flores, a partir do qual se observou um ligeiro decréscimo no número de flores. Nas plantas não induzidas (A-) o aparecimento de flores também ocorreu após o 21º dia, o aumento do número de flores foi gradual, atingindo uma média de 29,6 flores no 43º dia, neste grupo de plantas não se observou a fase de decréscimo do número de flores (Figura 3.7A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina B induzidas (B+), embora tal como nas plantas *wild type* tenha ocorrido o aparecimento de flores antes do 21º dia, o aumento do número de flores nesta construção foi gradual e não tão acentuado como nas plantas *wild type*. Nas plantas B+ houve um aumento de flores até ao 28º dia, atingindo uma média de 17,9 flores que se manteve até ao 35º dia, a partir do qual se observou um decréscimo no número de flores. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (B-) não se observou um declínio do número de flores durante o tempo de experiência recorrido, tendo-se observado uma média de 28,7 flores no 43º dia (Figura 3.7B).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina A induzidas (A+) pode-se observar uma média máxima de flores 23,9 e nas plantas transformadas com cardosina B induzidas (B+) pode-se observar uma média máxima de 17,9 flores, enquanto nas plantas *wild type* este máximo representou-se numa média de 35,9 flores. Nos 3 casos, houve um decréscimo no número de flores a partir do 35º dia, sendo este decréscimo menos acentuado nas plantas A+ (Figura 3.7C).

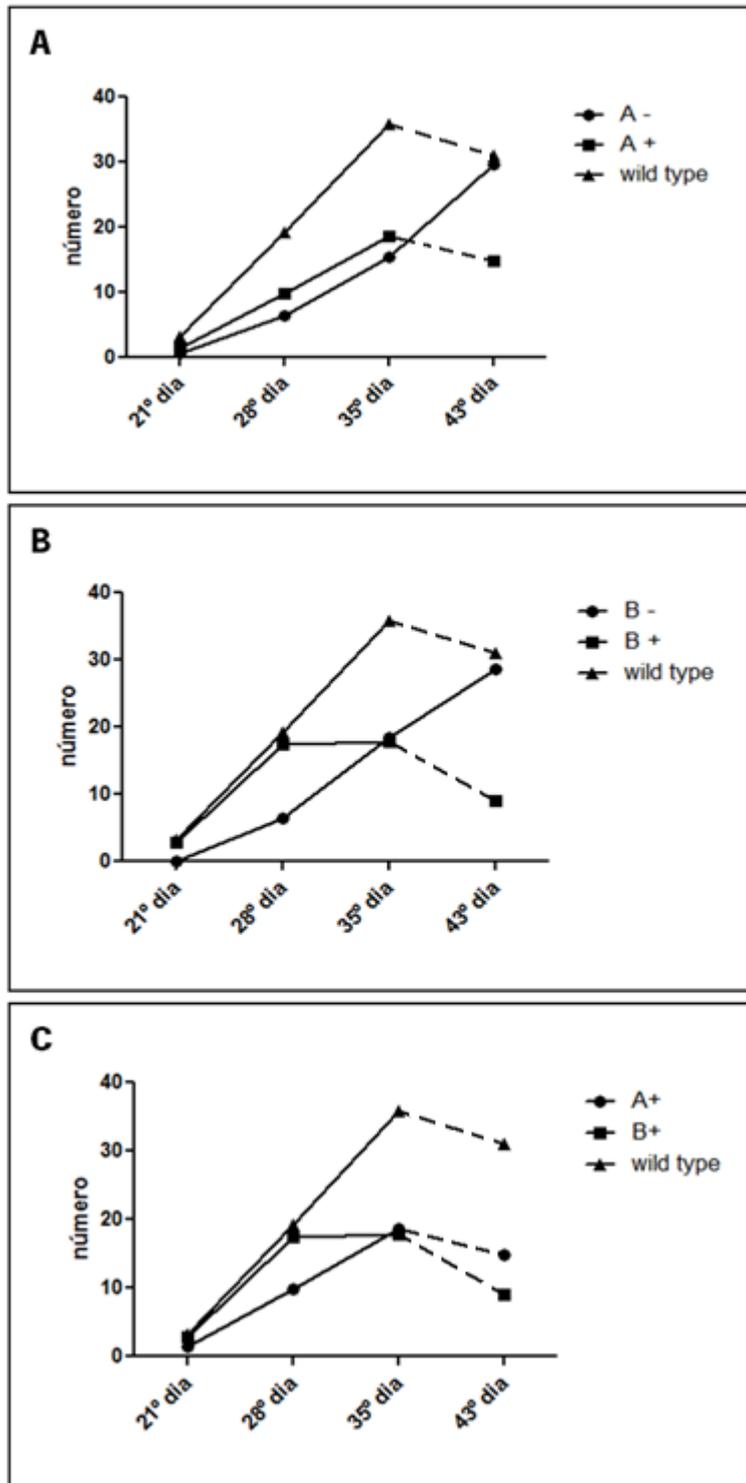


Figura 3.7 – Comparação do número de flores de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de flores de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de flores de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de flores de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 3-23 plantas.

3.1.1.8. Número de siliquas

As siliquas começaram a aparecer após o 21º dia nas plantas *wild type* e nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas (B+), e após o 28º dia nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A induzidas (A+) (Figura 3.8).

O aumento do número de siliquas, nas plantas *wild type*, foi muito pouco acentuado entre o 21º dia e o 28º dia, apresentando nesta altura uma média de 2,6 siliquas. A partir do 28º dia observou-se um aumento bastante acentuado no número de siliquas até ao 43º dia, no qual se podiam contabilizar uma média de 44,8 siliquas por planta (Figura 3.8).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica para cardosina A induzidas (A+) o número de siliquas começou por aumentar gradualmente entre o 28º dia e o 35º dia atingindo uma média de 6 siliquas, continuando a aumentar de forma mais acentuada até ao 43º dia, em que se podia contabilizar uma média de 23,9 siliquas por planta. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (A-) o número de siliquas começou a aumentar a partir do 28º dia atingindo uma média de 17,4 siliquas por planta ao 43º dia (Figura 3.8A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas (B+) o número de siliquas começou por aumentar muito lentamente entre o 21º dia e o 28º dia, em que apresentavam uma média de 0,9 siliquas. Continuando, de seguida, a aumentar de forma linear e acentuada até ao dia 43º dia, onde apresentavam uma média de 23 siliquas por planta. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (B+) apenas se observou um aumento do número de siliquas a partir do 35º dia atingindo uma média de 8,3 siliquas por planta ao 43º dia (Figura 3.8B).

As plantas *wild type* mostraram desde o início um maior número de siliquas, a partir do 28º dia, essa diferença tornou-se mais acentuada, apresentando estas plantas, no 43º dia, uma média de 44,8 siliquas, enquanto ambos grupos de plantas transformadas com cardosina A e B induzidas (A+ e B+) apresentavam uma média de 23 siliquas cada (Figura 3.8C).

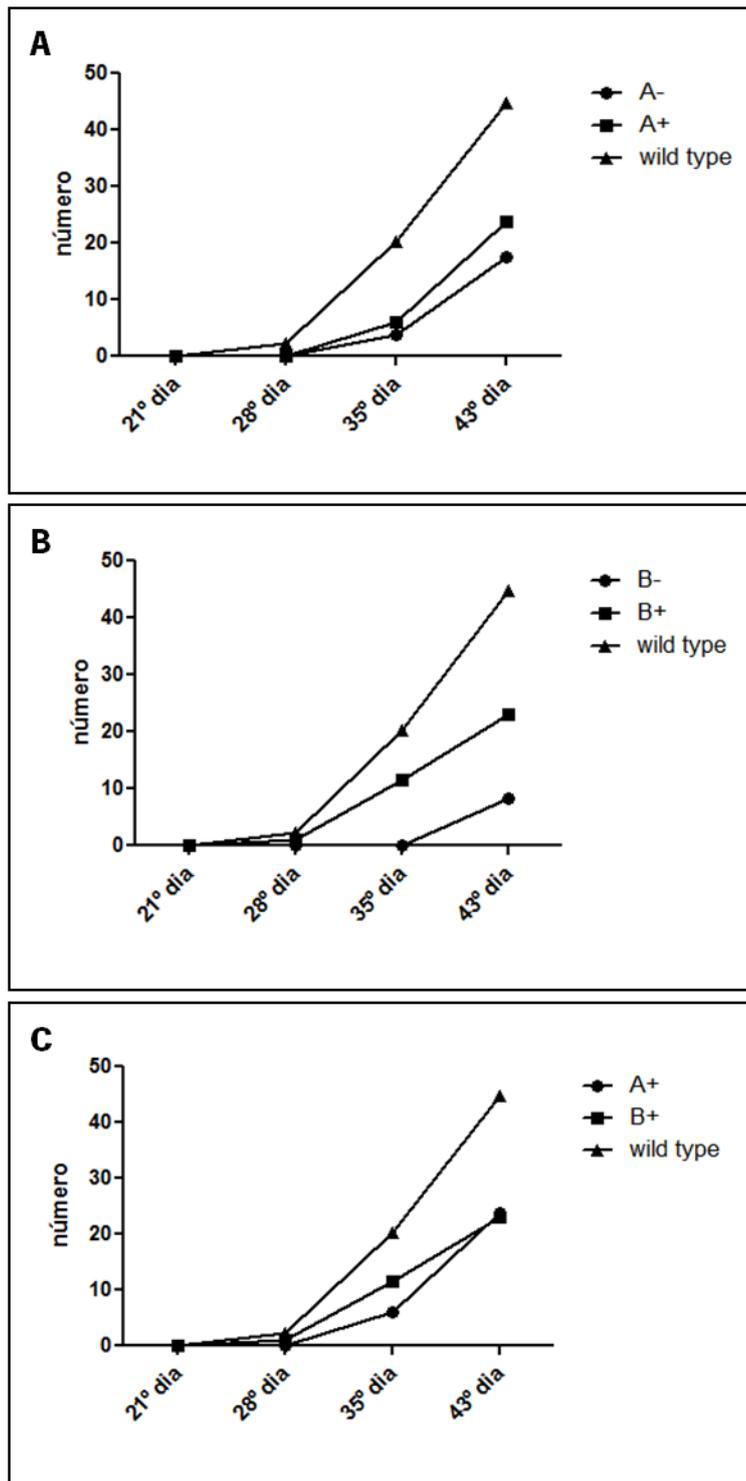


Figura 3.8 – Comparação do número de síliquas de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de síliquas de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de síliquas de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de síliquas de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 3-23 plantas.

3.1.1.9. Tamanho das síliquas

O tamanho das síliquas foi medido usando aleatoriamente uma síliqua de cada planta. Nas plantas *wild type* houve um crescimento acentuado do tamanho das síliquas desde o momento do seu aparecimento no 21º dia, quando as síliquas apresentavam uma média de 0,7 cm, até ao 35º dia. Após o qual, o crescimento médio das síliquas abrandou atingindo, no 43º dia, 1,1 cm (Figura 3.9).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A induzidas (A+) o crescimento foi acentuado desde o seu aparecimento até ao 43º dia, em que as síliquas apresentavam em média 1,02 cm. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (A-) ao 43º dia as síliquas apresentavam uma média de 0,78 cm (Figura 3.9A).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas (B+), o tamanho das síliquas no 28º dia era em média 0,2 cm. A partir do 28º dia, o crescimento das síliquas começou a ser mais notório, atingindo as síliquas 1,04 cm em média no 43º dia. Nas plantas transformadas com a mesma construção não induzidas (B-) as síliquas apresentavam uma média de 1 cm no 43º dia (Figura 3.9B).

O tamanho das síliquas nas plantas *wild type* foi sempre maior que nas restantes plantas transgênicas. No entanto, as plantas B+ apresentaram síliquas maiores do que as plantas A+ desde o início (Figura 3.9C).

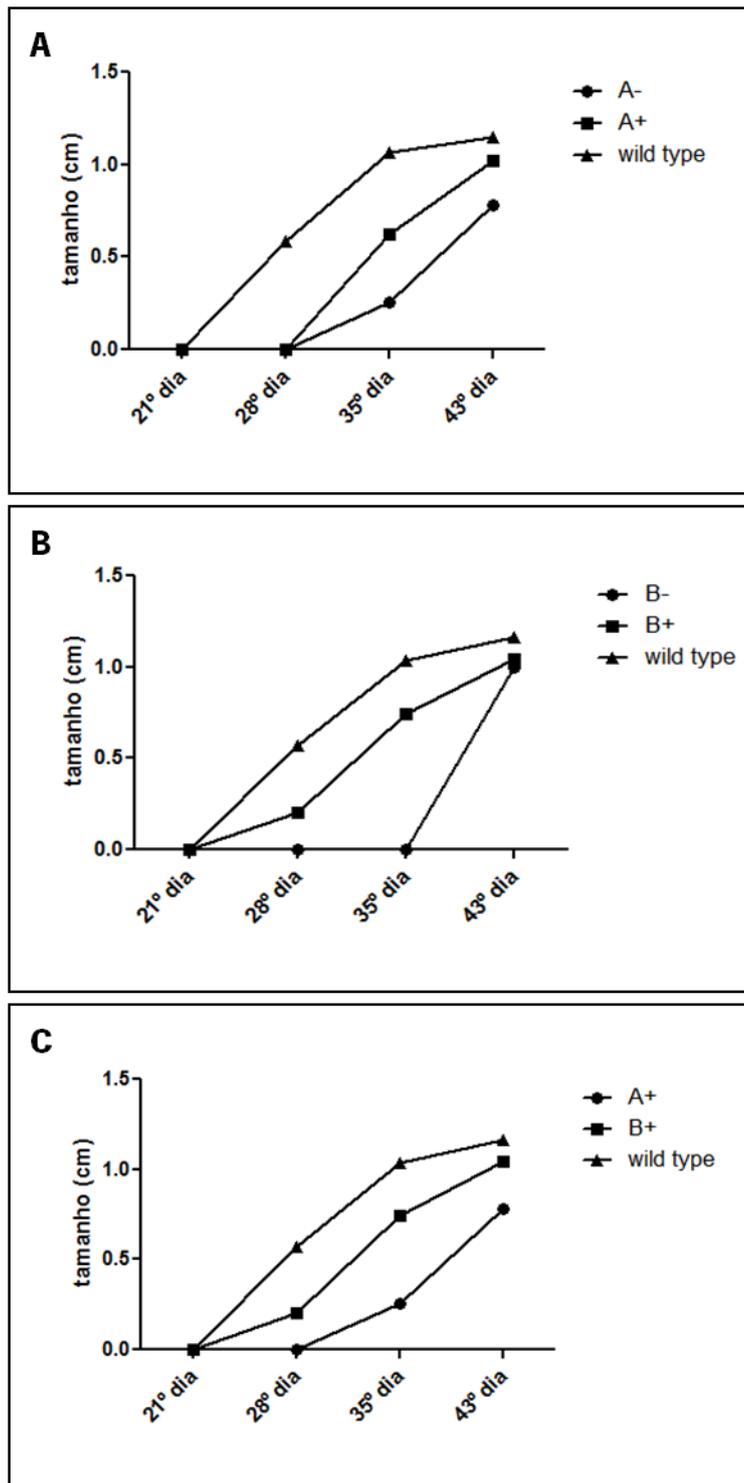


Figura 3.9 – Comparação do tamanho das siliques de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Tamanho das siliques de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Tamanho das siliques de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o tamanho das siliques de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 3-23 plantas.

Os valores máximos atingidos (em média) nos diferentes parâmetros referentes a este segundo ensaio estão representados na Tabela 3.1, onde se pode verificar com clareza um desenvolvimento maior das plantas *wild type* em relação às plantas transgênicas.

Tabela 3.1 – Comparação dos valores máximos (média) dos diferentes parâmetros analisados nas plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*.

	Wt	A+	A-	B+	B-	Valores máximos ao 43° dia (média)
comprimento raízes (mm)	65,1	56,9	49,9	54,2	44,3	
zona pilosa (mm)	60,2	40,7	30,5	45,4	34,3	
n° raízes laterais	40,2	25,5	24,1	28,8	22,7	
cotilédones (cm)	3,1	2,9	2,8	2,6	2,5	
n° hastes principais	2,9	2	2,3	2	2,7	
altura hastes florais (cm)	24,3	19,2	19,2	16,4	19,4	
n° flores	35,9	23,9 ^a	29,6	17,9a	28,7	
n° silíquas	44,8	23,9	17,4	23	8,33	
tamanho silíquas (cm)	1,1	1,02	0,78	1	1,04	
a - valor máximo (média) ao 35° dia						

3.1.2. Segundo ensaio

Tendo em consideração os resultados do ensaio preliminar, procedeu-se à realização de um segundo ensaio, no qual se avaliou o comprimento das raízes e número de raízes laterais, assim como o número de flores. Neste segundo ensaio foram alterados alguns parâmetros de avaliação de modo a tornar mais fidedigna a caracterização, motivo pelo qual as plantas que serviram de controlo foram regadas com DMSO diluído em água para sujeitar as plantas às mesmas condições de stresse. O comprimento das raízes e número de raízes laterais foram medidos, após vernalização, apenas até ao 12° dia (com 2 a 3 dias de intervalo), ou seja, enquanto as plântulas se encontravam na placa de Petri. Após esse período transferiram-se as plântulas para substrato sólido, não sendo, por isso, possível avaliar estes parâmetros.

3.1.2.1. Comprimento da raiz principal

Relativamente ao comprimento das raízes (Figura 3.10A), nas plantas *wild type* as raízes cresceram de forma linear até ao 7º dia abrandando o crescimento até ao 12º dia, onde apresentavam um comprimento médio de 32 mm (Figura 3.10A).

O crescimento das plantas das linhas que continham a construção que codifica a cardosina A foi semelhante entre as plantas induzidas com Dex (A+) e as não induzidas (A-) (Figura 3.10A). As raízes foram crescendo lentamente até ao 7º dia quando apresentavam uma média de 7,8 mm de comprimento nas plantas A+ e 8,8 nas plantas A-. A partir deste dia, até ao 10º dia, sofreram um crescimento acentuado até aos 21,6 mm de comprimento, no caso das plantas induzidas, e de 19,5 mm de comprimento, no caso das plantas não induzidas (Figura 3.10A). Estes dados revelam um ligeiro aumento do crescimento das raízes das plantas induzidas em relação às não induzidas. A partir do 10º até ao 12º dia o crescimento de ambas as linhas (induzidas e não induzidas) foi menos acentuado (Figura 3.10A).

Tal como no caso das plantas da linha de cardosina A, nas plantas que continham a construção que codifica a cardosina B induzidas (B+) e não induzidas (B-) (Figura 3.10B) mantiveram um crescimento semelhante entre si, apesar de as plantas induzidas terem um crescimento ligeiramente mais acentuado que as não induzidas. Em ambos os casos o crescimento foi muito reduzido até o 7º dia, tendo aumentado progressivamente até uma média de 11,5 mm de comprimento, no caso das plantas induzidas, e até cerca de 7 mm de comprimento no caso das plantas não induzidas (Figura 3.10).

Através da análise do gráfico C (Figura 3.10), e comparando as linhas transgênicas de cardosina A com as de cardosina B, pode-se também constatar que as raízes das plantas da linha de cardosina A apresentaram um crescimento maior que as da linha de cardosina B. A partir do 7º dia as raízes da linha de cardosina A sofrem um crescimento bastante acentuado, que não é observado na linha a expressar cardosina B. Este aumento traduz-se, no fim do ensaio, por uma diferença bastante significativa, em que as raízes das plantas a expressar cardosina A apresentam um comprimento duas vezes superior ao das plantas da linha a expressar cardosina B. O crescimento das plantas *wild type* mostrou-se sempre maior que nas plantas transformadas (Figura 3.10C).

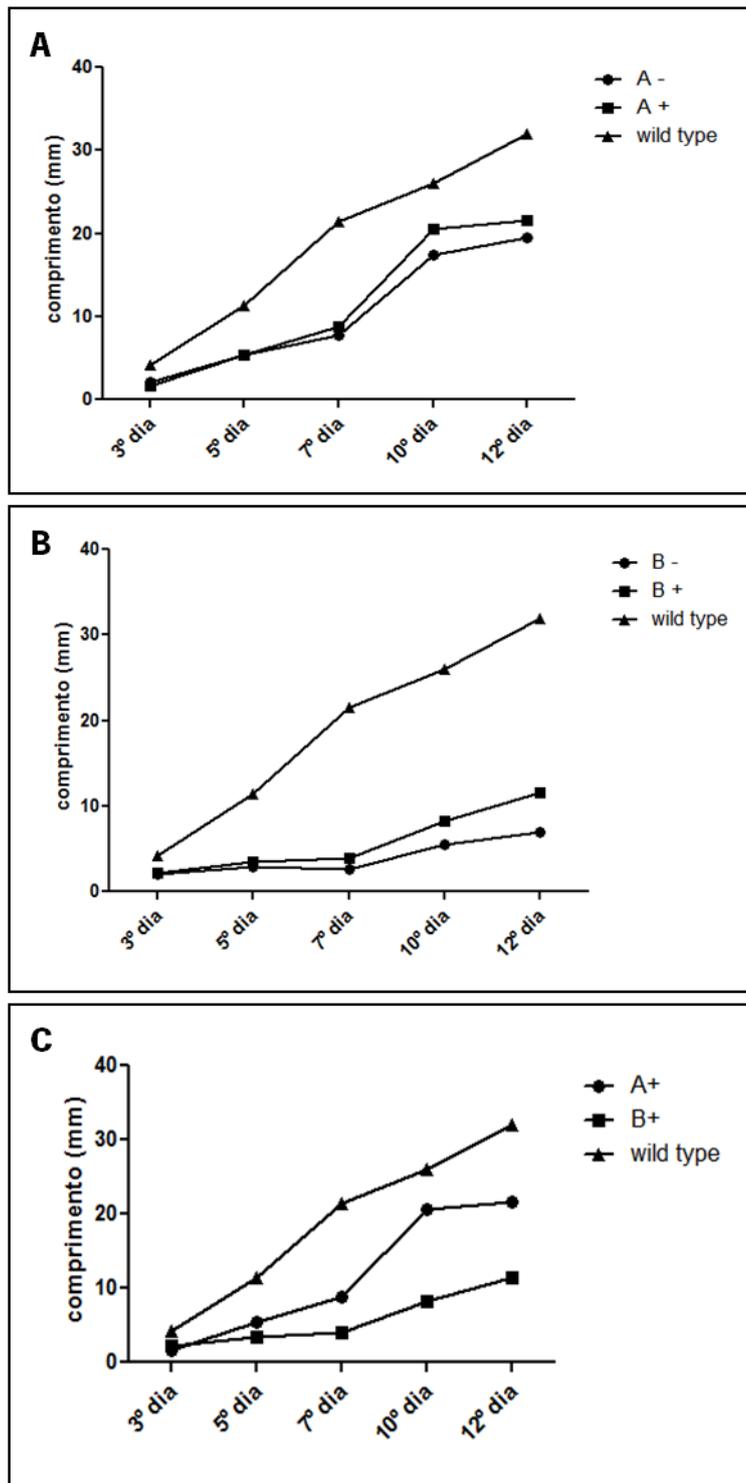


Figura 3.10 – Comparação do comprimento das raízes de plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type* ao longo do desenvolvimento. (A) Comprimento das raízes de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Comprimento das raízes de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação do comprimento das raízes de plântulas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 17-28 plântulas.

3.1.2.2. Número de raízes laterais

No que diz respeito ao número de raízes laterais (Figura 3.11), nas plantas *wild type* este foi aumentando de forma gradual até ao 7º dia, a partir do qual começou a aumentar de forma exponencial até atingir em média 20,7 raízes laterais por planta (Figura 3.11).

O número de raízes laterais nas plantas com a construção que codifica para a cardosina A foi semelhante tanto nas induzidas (A+) como nas não induzidas (A-), praticamente não existindo raízes laterais (Figura 3.11A). Estas começaram a aparecer e aumentar, principalmente a partir do 7º dia até uma média de 6 e 5,5 raízes laterais por planta ao 12º dia nas plantas A+ e A- respectivamente (Figura 3.11A).

O número de raízes laterais nas plantas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas (B+) foi ligeiramente superior em relação ao das plantas não induzidas (B-) ao longo do tempo (Figura 3.11B). No entanto, em ambos os casos, o número de raízes laterais foi aumentando de forma gradual até ao 12º dia, em que as plantas induzidas atingem uma média de 8 raízes laterais por planta, e as não induzidas uma média de 5,2 raízes laterais (Figura 3.11B).

Comparando com as plantas *wild type*, o número de raízes laterais total no final do ensaio era quatro vezes menor nas plantas transformadas com cardosina A (Figura 3.11C). Tal como no caso das plantas transformadas com cardosina A, comparando com as plantas *wild type*, o número de raízes laterais total no final do ensaio era quatro vezes menor nas plantas transformadas com cardosina B (Figura 3.11C). No entanto as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B possuíam um maior número de raízes laterais que as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A (Figura 3.11).

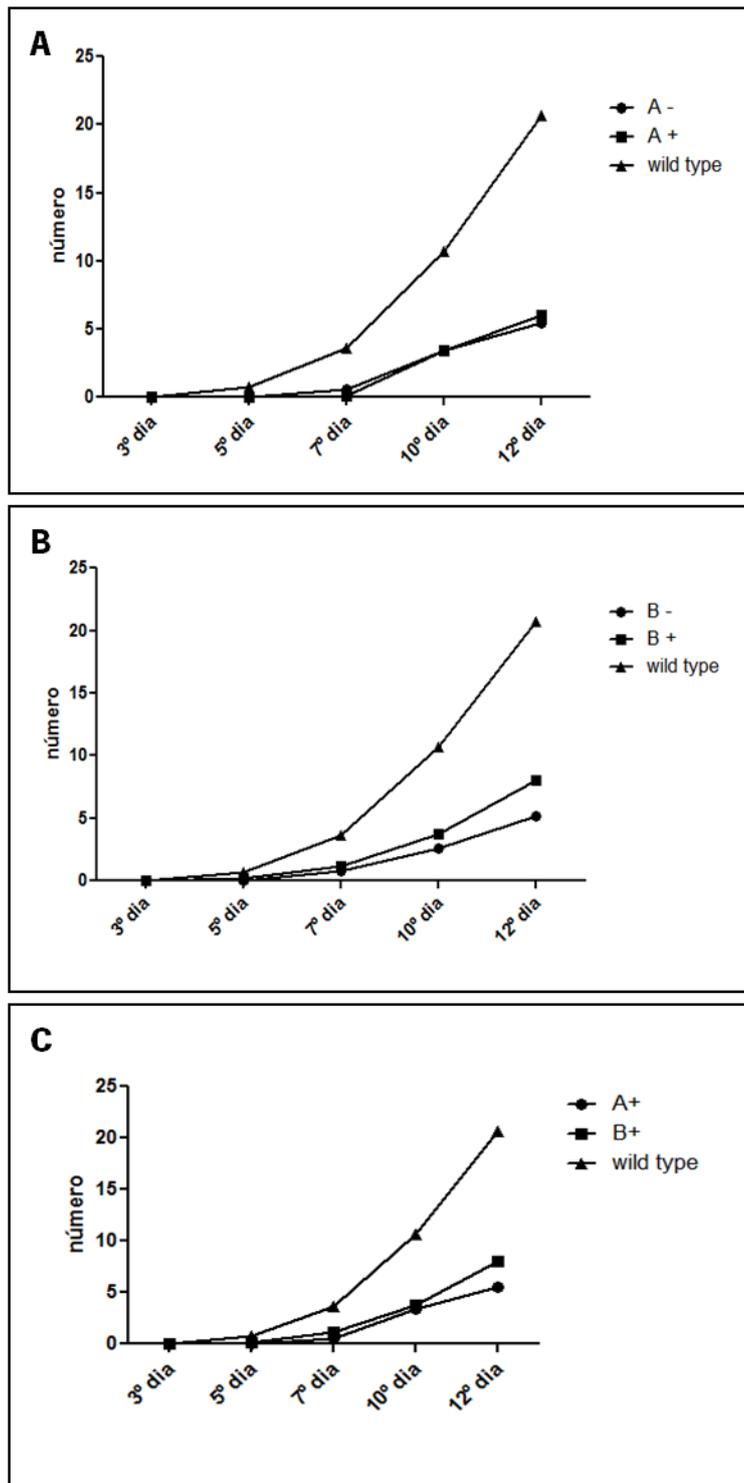


Figura 3.11 – Comparação entre o número de raízes laterais de plântulas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de raízes laterais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de raízes laterais de plântulas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de raízes laterais de plântulas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 17-28 plântulas.

3.1.2.3. Número de flores

No que respeita ao número de flores, este começou a ser contabilizado a partir do 18º dia, ou seja, 6 dias após se transferirem as plantas para substrato sólido, que corresponde ao período em que começam a surgir as hastes florais (Figura 3.12).

As plantas *wild type* apresentaram um desenvolvimento mais rápido do que as plantas transgênicas, começando as flores, e mais tarde as siliquas, a aparecer mais cedo nestas plantas (Figura 3.12). O número de flores das plantas *wild type* aumenta de forma exponencial até ao 30º dia, em que apresenta uma média de 26,9 flores por planta, começando a diminuir posteriormente, correspondendo esta diminuição ao aparecimento das siliquas (Figura 3.12).

Nas plantas transformadas com a construção que codifica a cardosina A e depois de induzidas (A+), o número de flores vai aumentando de forma linear até ao 33º dia, onde atinge uma média de 27,8 flores por planta (Figura 3.12A). Nas plantas com a mesma construção, mas não induzidas (A-), o número de flores vai aumentando de forma gradual até ao 26º dia, e neste ponto sofre um aumento um pouco mais acentuado até uma média de 19,7 flores por planta ao 33º dia (Figura 3.12A). A partir deste dia deixou de se contabilizar o número de flores, não de verificando por isso a diminuição do número das mesmas.

Quanto ao número de flores nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B, e depois de induzidas (B+), este vai aumentando de forma gradual até uma média de 22,9 flores por planta ao 33º dia (Figura 3.12B). Nas plantas não induzidas (B-) o número de flores por planta vai aumentando gradualmente, sendo este aumento mais acentuado a partir do 26º dia, ao 33º dia estas plantas possuem em média 19,9 flores por planta (Figura 3.12B).

As plantas transgênicas não induzidas comportaram-se de forma idêntica às plantas induzidas (Figura 3.12). No entanto, nas não induzidas podemos verificar que as plantas da linha da cardosina A possuem um maior número de flores no final dos 33 dias de experiência, relativamente às restantes plantas transgênicas (Figura 3.12A). Como referido anteriormente, as plantas *wild type* possuem um maior número de flores desde o início em relação aos restantes grupos de plantas, com excepção das plantas A+ que, embora mais tarde, atingem valores maiores de flores (Figura 3.12C).

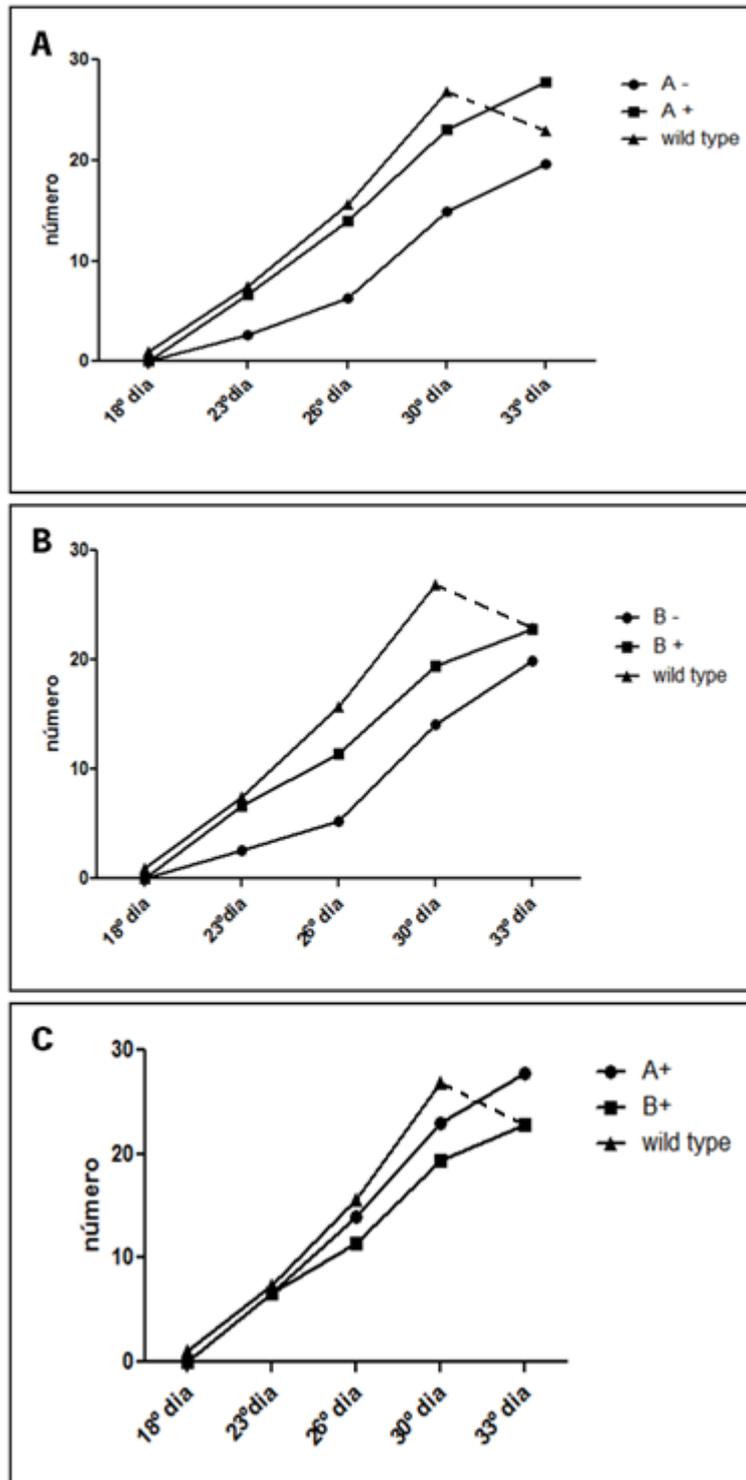


Figura 3.12 – Comparação do número de flores de plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*. (A) Número de flores de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina A, não induzidas (A-) e induzidas (A+) com dexametasona. (B) Número de flores de plantas da linha de *Arabidopsis* transformada com cardosina B, não induzidas (B-) e induzidas (B+) com dexametasona. (C) Comparação entre o número de flores de plantas de linhas transgênicas induzidas de *Arabidopsis* (A+ e B+) e *wild type*. Os valores correspondem à média de 9-17 plantas.

Os valores máximos atingidos (em média) nos diferentes parâmetros referentes a este segundo ensaio estão representados na Tabela 3.2, onde se pode verificar com clareza um desenvolvimento maior das plantas *wild type* em relação às plantas transgênicas, tal como no ensaio preliminar.

Tabela 3.2 – Comparação dos valores máximos (média) referentes aos diferentes parâmetros analisados nas plantas de linhas transgênicas de *Arabidopsis* e *wild type*.

	Wt	A+	A-	B+	B-	Valores máximos ao 33º dia (média)
comprimento raízes (mm)	32	20	18	9	6	
nº raízes laterais	20,7	5	5	7	5	
nº flores	26,9a	28	18	21	20	
a - valor máximo (média) ao 30º dia						

3.2. Coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter GUS nas flores

Recolheram-se flores fechadas e abertas pertencentes a linhas transgênicas de *Arabidopsis* com expressão indutível e estável de cardosina A e cardosina B. Foram recolhidas flores previamente induzidas com Dex e flores não induzidas, servindo estas últimas de controlo. Sujeitaram-se as flores à coloração histoquímica da β -glucuronidase para detectar o produto do gene repórter presente na construção. A β -glucuronidase metaboliza o substracto X-Gluc formando um precipitado de cor azul. A detecção do precipitado azul num determinado tecido é indicativa da expressão do transgene nesse mesmo tecido, já que o transgene e o repórter estão sob acção do mesmo promotor.

Tanto as flores fechadas como as abertas da linha de cardosina A induzida apresentam uma coloração azul em quase toda a flor, enquanto no que se refere às flores da mesma linha não induzidas, apenas uma flor fechada (em doze flores testadas) e uma flor aberta (em quatro flores testadas) apresentavam coloração azul ténue, provavelmente resultado de uma falha de manipulação (Figura 3.13).

Metade das flores abertas da linha de cardosina B induzida apresentava coloração azul apenas em parte da flor (Figura 3.13). Tanto as flores fechadas induzidas, como as flores fechadas e abertas não induzidas, não apresentavam qualquer coloração azul (Figura 3.13).

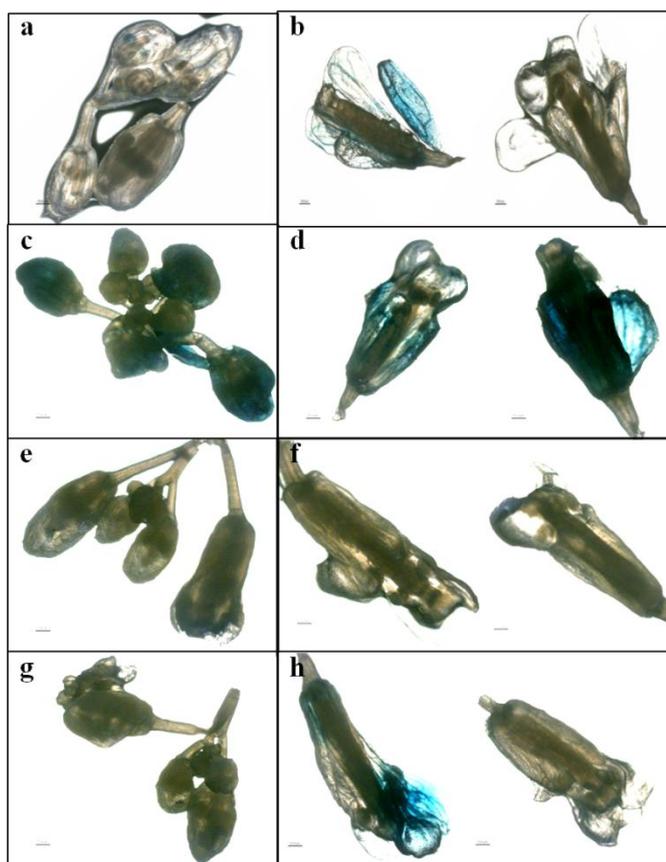


Figura 3.13 – Detecção histoquímica *in situ* da expressão do gene repórter *Gus* em flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis*. Foram utilizadas flores fechadas (a, c, e, g) e abertas (b, d, f, h) de linhas de *Arabidopsis* transformadas com cardosina A (a-d) e B (e-h), não induzidas (a-b, e-f) e induzidas (c-d, g-h) com dexametasona. O precipitado azul corresponde à expressão *in situ* do gene repórter.

3.3. Localização das cardosinas A e B nas flores

De modo a estudar a localização das cardosinas A e B nas flores de *A. thaliana*, recolheram-se flores abertas e fechadas de linhas indutíveis com expressão estável de cardosina A e de cardosina B, induzidas desde o início (Dex¹) e induzidas aquando do aparecimento das hastes florais (Dex²).

Foi realizada imunolocalização das cardosinas A e B em linhas induzidas desde o início e induzidas aquando do aparecimento das hastes com anticorpos específicos para cada cardosina. Como controlo da especificidade do anticorpo secundário, realizou-se também, uma imunolocalização em linhas induzidas desde o início sem o anticorpo primário. Realizou-se ainda

imunolocalização em plantas não induzidas com o anticorpo primário de modo a aferir a especificidade do mesmo.

Os resultados foram avaliados por microscopia confocal de varrimento a laser (CLSM) e para recolha das imagens foram utilizados dois comprimentos de onda de excitação, um de 488 nm revelando, a verde, a marcação relativa ao anticorpo secundário associado às cardosinas, e outro de 514 nm que permite captar a autofluorescência natural das estruturas celulares, a vermelho. Estas duas imagens captadas foram posteriormente sobrepostas. No caso das flores fechadas observaram-se cortes de estigma, ovário e anteras, enquanto nas flores abertas restringiu-se o estudo aos tecidos do ovário, porque os restantes órgãos encontravam-se já em estado avançado de desenvolvimento e não foi possível obter secções e imagens em bom estado.

Através da observação ao microscópio óptico, e numa baixa ampliação, pôde-se identificar algumas diferenças anatómicas entre as flores fechadas e as flores abertas. As flores fechadas mantinham, na sua maioria, total integridade podendo observar-se o estigma, os ovários e as anteras (Figura 3.14 a). Em algumas flores fechadas, o estigma encontrava-se desenvolvido sendo possível observar as papilas estigmáticas. Os óvulos não se encontravam diferenciados, no entanto, na maioria dos casos, era possível observarem-se os grãos de pólen dentro das anteras, que estavam ainda fechadas (Figura 3.14 a). Nos ovários das flores abertas era possível observar os óvulos diferenciados com nucelo e o saco embrionário bem individualizados (Figura 3.14 b). Em alguns casos observaram-se anteras já deiscentes e sem grãos de pólen e estigmas desintegrados com citoplasma retraído.

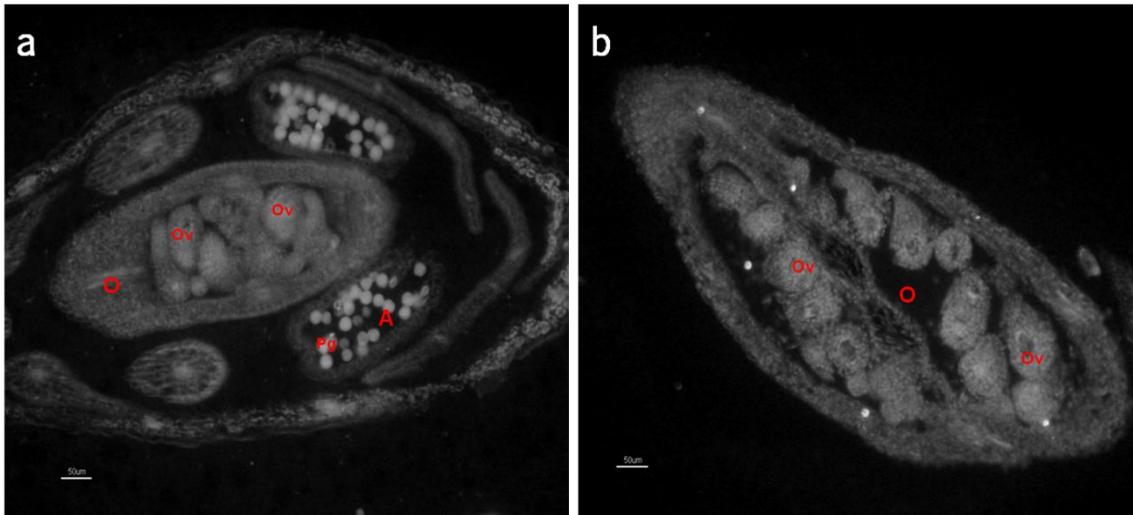


Figura 3.14 – Secções longitudinais de flores de *Arabidopsis*. a - Flor fechada. b – Flor aberta. É possível se observar grãos de pólen (gp) nas anteras (A) na flor fechada (a). Também é possível se distinguir os diferentes estádios de desenvolvimento dos óvulos (Ov) dentro dos ovários das flores fechada (a) e aberta (b).

3.3.1. Localização da cardosina A em flores

Relativamente às plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A Dex^{fl}, nas flores fechadas era possível observar uma marcação pontuada no citoplasma e em alguns vacúolos das células corticais do estigma, imediatamente abaixo das papilas estigmáticas (Figura 3.15 a-c). Nas restantes células do estigma apenas se observou marcação no citoplasma e em muito menor quantidade (Figura 3.15 a-c). Quanto à zona do ovário observou-se uma marcação pontuada, mais acentuada no citoplasma das células da zona central da maioria dos óvulos, embora também fosse possível observar marcação no citoplasma das restantes células do ovário, embora com menor intensidade (Figura 3.15 d-f). Nas anteras era visível marcação no citoplasma do interior dos grãos de pólen já maduros, assim como no citoplasma e em alguns vacúolos das células do tapete (Figura 3.15 g-i). Na zona do endotécio não parecia haver marcação, no entanto, na restante antera existia alguma fluorescência, sendo esta mais proeminente nas células do tapete, grãos de pólen e nos vasos condutores na zona de inserção do estilete (Figura 3.15 g-i).

Relativamente à flor aberta observou-se marcação no citoplasma das células do ovário, sendo esta marcação mais evidente na zona central dos óvulos, isto é, na zona do nucelo e saco embrionário (Figura 3.15 j-l).

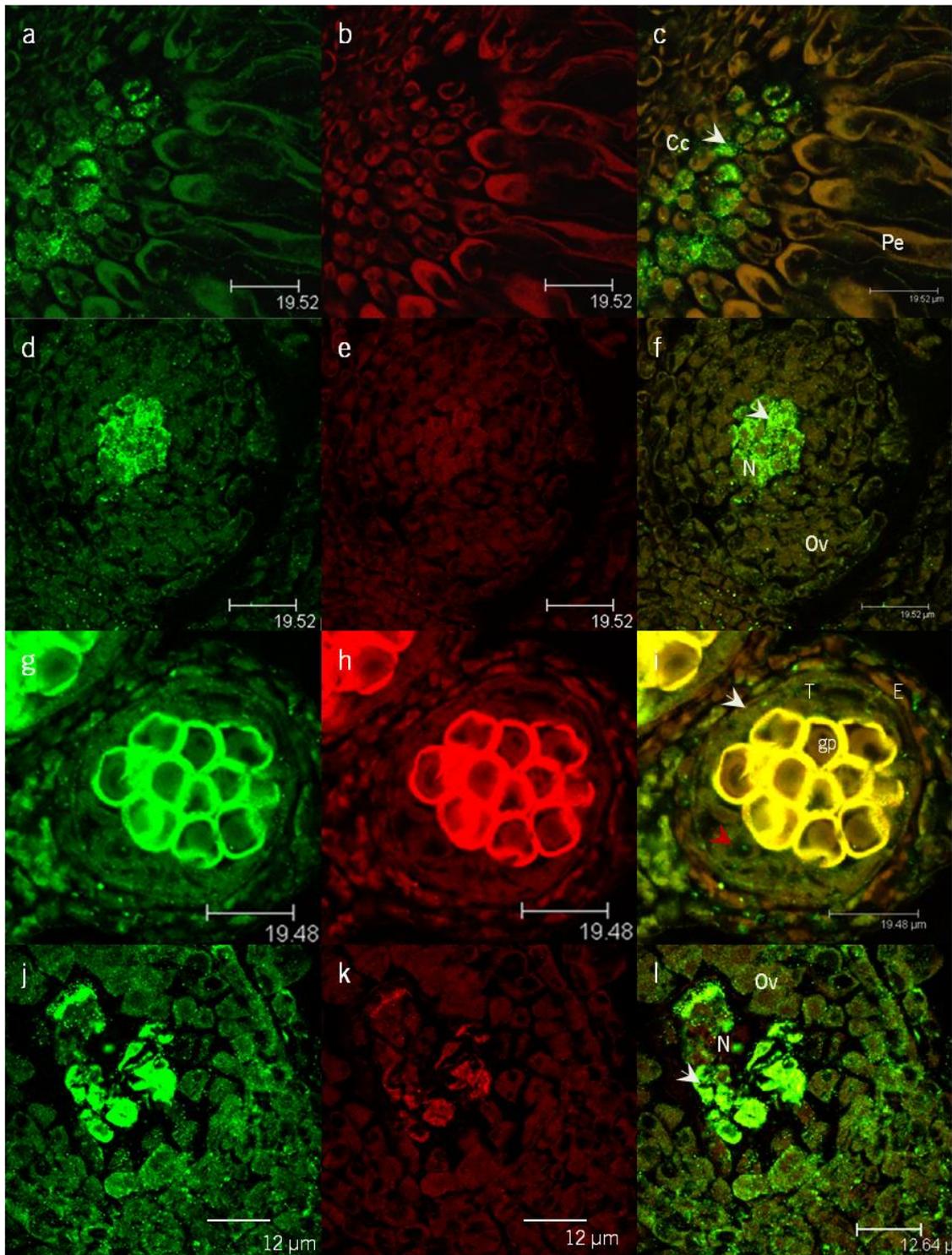


Figura 3.15 – Imunolocalização de cardosina A em secções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis* induzidas com dexametasona aquando do aparecimento de hastes florais. Nas flores fechadas, a marcação de cardosina A foi detectada nas células do estigma (a-c) principalmente nas células corticais (Cc) abaixo das papilas estigmáticas (Pe). Foi também observada marcação na zona central dos óvulos (d-f), e nos vacúolos e citoplasma das células do tapete (T) das anteras (g-i). Nas flores abertas a cardosina A foi detectada com maior intensidade na zona do nucelo (N) dos óvulos (ov) (j-l). As setas vermelhas indicam marcação nos vacúolos, enquanto as setas brancas indicam a marcação no citoplasma das células. A marcação foi detectada a verde

(imagens à esquerda) e a autofluorescência a vermelho (imagens centrais). As imagens à direita correspondem à sobreposição das anteriores.

Quanto às plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A Dex⁺ observou-se uma marcação menos acentuada relativamente à observada nas plantas induzidas apenas após o aparecimento da haste floral (Figuras 3.15 e 3.16).

No que respeita às flores fechadas verificou-se uma marcação pontuada no citoplasma das células do estigma, principalmente na zona cortical, logo abaixo das papilas estigmáticas (Figura 3.16 a-c). O mesmo tipo de marcação era também observado ao nível das células das papilas (Figura 3.16 a-c). Nos restantes tecidos do estigma a marcação não era tão evidente. Em relação ao ovário pôde-se observar uma marcação pontuada no citoplasma das células podendo-se distinguir o núcleo que apresentava uma coloração alaranjada, e os vacúolos (a preto), principalmente nos óvulos (Figura 3.16 d-f). Nas anteras observou-se uma marcação pontuada no citoplasma das células do córtex, principalmente na zona de inserção do filete (Figura 3.16 g-i). Também foi possível observar-se marcação no interior dos vacúolos das células do tapete e grãos de pólen, sendo esta marcação muito menos acentuada que nas plantas Dex⁺ (Figura 3.16 g-i).

Quanto à flor aberta verificou-se marcação no citoplasma das células do ovário com maior realce na zona correspondente ao nucelo e ao saco embrionário (Figura 3.16 g-i).

Em todas as situações a marcação observada nas plantas Dex⁺ foi menos acentuada que nas plantas Dex⁺ (Figuras 3.15 e 3.16).

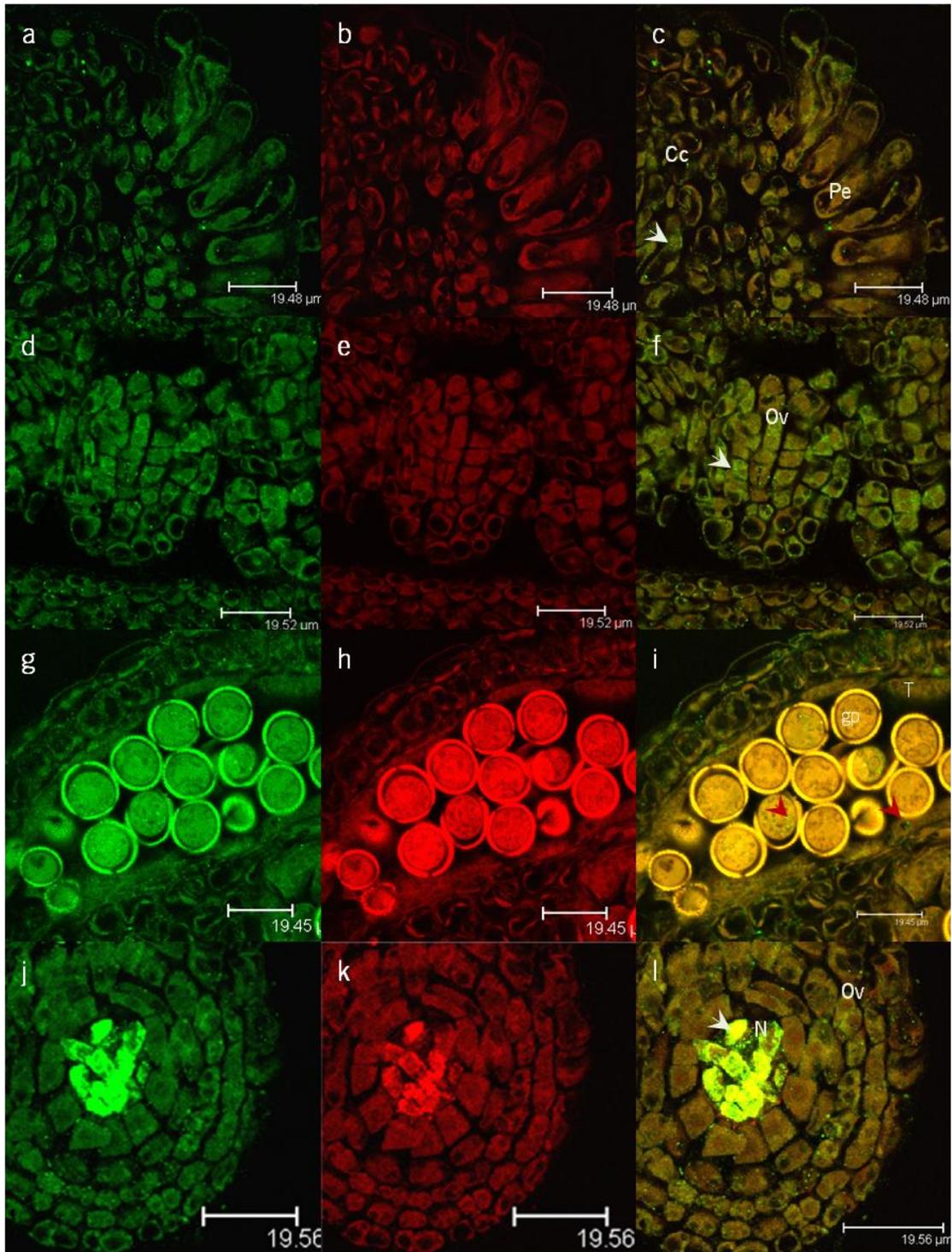


Figura 3.16 – Imunolocalização de cardosina A em secções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis* induzidas com dexametasona desde o início da germinação. Nas flores fechadas, a marcação de cardosina A foi detectada nas células do estigma tanto nas células corticais (Cc) como nas papilas estigmáticas (Pe) (a-c), células do óvulo (Ov) (d-f), células do tapete (T) e grãos de pólen (gp) nas anteras (g-i). Nas flores abertas a marcação de cardosina A foi detectada com maior intensidade na zona do nucelo (N) dos óvulos (Ov) (j-l). As setas vermelhas indicam a marcação nos vacúolos, enquanto as setas brancas indicam a marcação no citoplasma das células. A marcação foi detectada a verde (imagens à esquerda) e a autofluorescência a vermelho (imagens centrais). As imagens à direita correspondem à sobreposição das anteriores.

Relativamente às plantas transformadas com cardosina A, e observando os controlos (sem anticorpo primário) de plantas induzidas com Dex desde o início detectou-se uma coloração alaranjada consistente com a sobreposição do verde e do vermelho, não havendo por isso marcação nessas zonas e confirmando que o anticorpo secundário não se liga inespecificamente a estes tecidos (Figura 3.17 coluna esquerda).

No entanto, nos controlos de plantas sem indução e nos quais foi realizada imunolocalização com anti-A, observou-se alguma fluorescência verde que deverá corresponder a uma marcação inespecífica em alguns espaços intercelulares e também dentro das células dos ovários das flores abertas (Figura 3.17 h). No caso das flores fechadas esta marcação também foi possível ser observada tanto no ovário como no estigma e anteras, embora com menor intensidade que no caso das flores abertas (Figura 3.17 coluna direita).

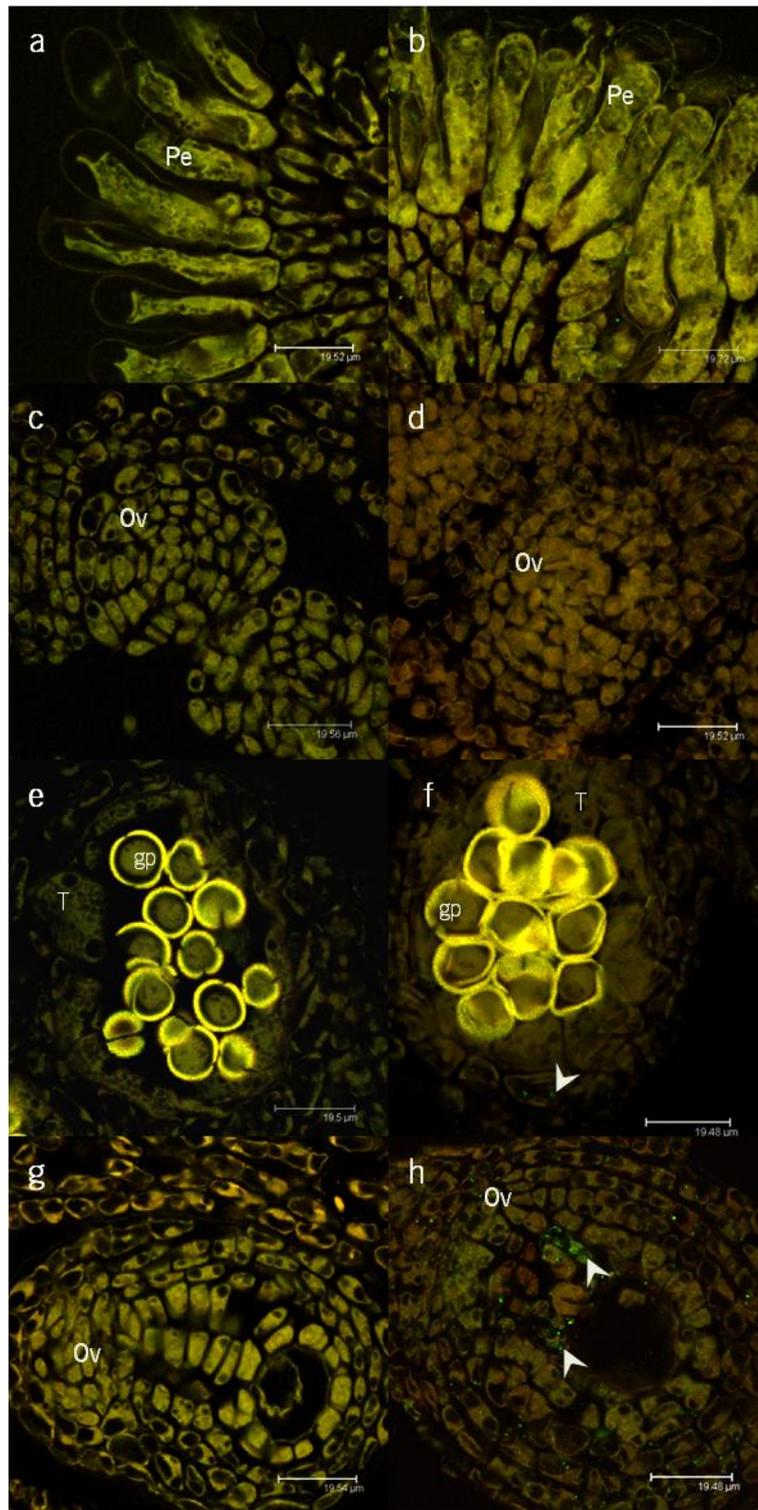


Figura 3.17 – Controlos de imunolocalização da cardosina A em secções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis*. Coluna esquerda – plantas induzidas desde o início do desenvolvimento, nas quais foi realizada imunolocalização sem anticorpo primário; coluna direita – plantas não induzidas –secções incubadas com anti-cardosina A e com Alexa Fluor® 488 associado ao anticorpo secundário. Foi possível ver-se nas imagens secções de estigmas evidenciando as papilas estigmáticas (Pe) (a-b), ovários com óvulos (Ov) (c-d) e anteras evidenciando as células do tapete (T) e grãos de pólen (gp) (e-f) de flores fechadas (a-f) e óvulos (Ov) de flores abertas (g-h). Nas plantas não induzidas, foi detectada alguma marcação (setas brancas) nas anteras das

flores fechadas, assim como nos óvulos das flores abertas. As imagens apresentadas correspondem à sobreposição da fluorescência obtida com o Alexa 488, a verde, e a autofluorescência, a vermelho.

3.3.2. Localização da cardosina B em flores

Relativamente às plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B Dex[®] pôde-se observar uma marcação verde pontuada no citoplasma das células do estigma das flores fechadas, principalmente nas células do córtex (Figura 3.18 a-c). Fortuitamente notou-se uma marcação pontuada nos espaços intercelulares e junto à parede das células, assim como na cutícula que reveste as papilas estigmáticas (Figura 3.18 a-c). Nos ovários das flores fechadas verificou-se marcação no interior das células no citoplasma, esta marcação estava presente em todo ovário, principalmente no óvulo (Figura 3.18 d-f). Verificou-se marcação ocasional no ovário junto das paredes celulares e espaços intercelulares, sendo esta marcação visível também nas anteras (Figura 3.18 d-i). Neste órgão pôde-se observar marcação pontuada no citoplasma dos grãos de pólen e nas células do tapete (Figura 3.18 g-i).

Relativamente à flor aberta, observou-se marcação no citoplasma das células do ovário, principalmente do óvulo. No entanto, na zona central no óvulo correspondente ao saco embrionário e nucelo não se verificou uma marcação acentuada (Figura 3.18 j-l).

Comparando os órgãos florais analisados neste estudo, a marcação no ovário das flores fechadas e abertas foi a mais evidente nas plantas transformadas com cardosina A (Figuras 3.15 e 3.18 c-f-l)

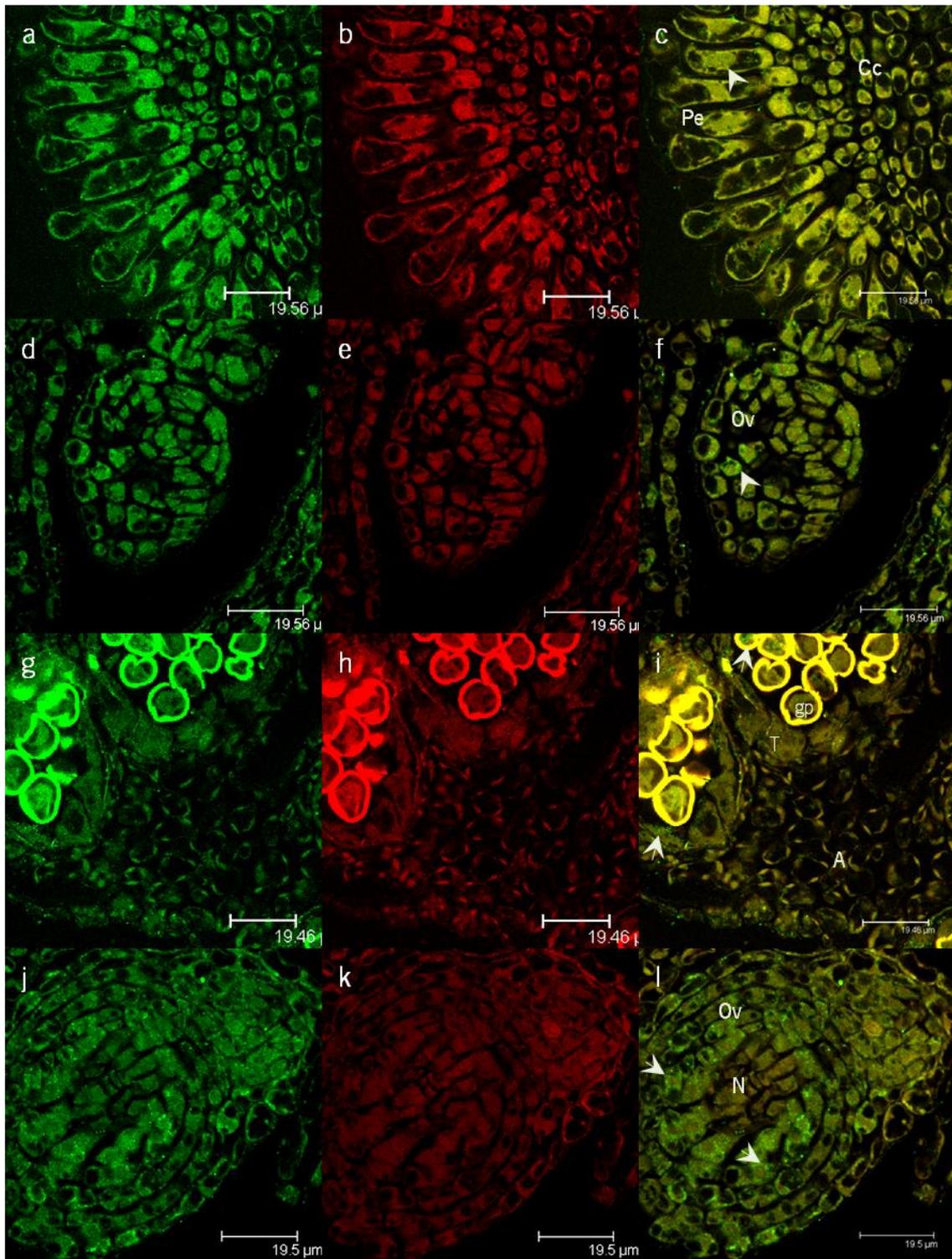


Figura 3.18 – Imunolocalização de cardosina B em seções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis* induzidas com dexametasona aquando do aparecimento de hastes. Nas flores fechadas, a marcação de cardosina B é detectada nas células corticais (Cc) e papilas estigmáticas do estigma (a-c), nas células dos óvulos (Ov) (d-f), e células do tapete (T) e grãos de pólen (gp) nas anteras (A) (g-i). Nas flores abertas, a marcação de cardosina B foi detectada em todo o óvulo (Ov) com excepção da zona do nucelo (N) (j-l). As setas brancas indicam a marcação no citoplasma das células. A marcação foi detectada a verde (imagens à esquerda) e a autofluorescência a vermelho (imagens centrais). As imagens à direita correspondem à sobreposição das anteriores.

No que respeita às plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas desde o início observou-se, nas flores fechadas, alguma marcação pontuada no citoplasma das células do estigma, assim como na cutícula que reveste as papilas estigmáticas (Figura 3.19 a-c). No ovário a marcação foi detectada no citoplasma das células, principalmente na zona do óvulo (Figura 3.19 d-f). Nas anteras a marcação mais notória encontrava-se no citoplasma e em alguns vacúolos das células do tapete, embora também fosse possível observar marcação no citoplasma das restantes células da antera, incluindo nos grãos de pólen (Figura 3.19 g-i). Por toda a flor fechada foi possível verificar-se, nos órgãos observados, alguma marcação pontuada nos espaços intercelulares e junto à parede celular.

Na flor aberta pode-se observar alguma marcação no citoplasma do ovário, incluindo nos óvulos, nos quais não se verifica marcação evidente na zona do saco embrionário (Figura 3.19 j-l).

A marcação observada nas plantas transformadas com cardosina B foi menor relativamente à marcação observada nas plantas transformadas com cardosina A. No entanto, considerando apenas as plantas a expressar cardosina B observou-se uma maior marcação nas plantas Dex^H em relação às plantas Dex^L no que respeita aos ovários das flores abertas e fechadas (Figuras 3.18 e 3.19).

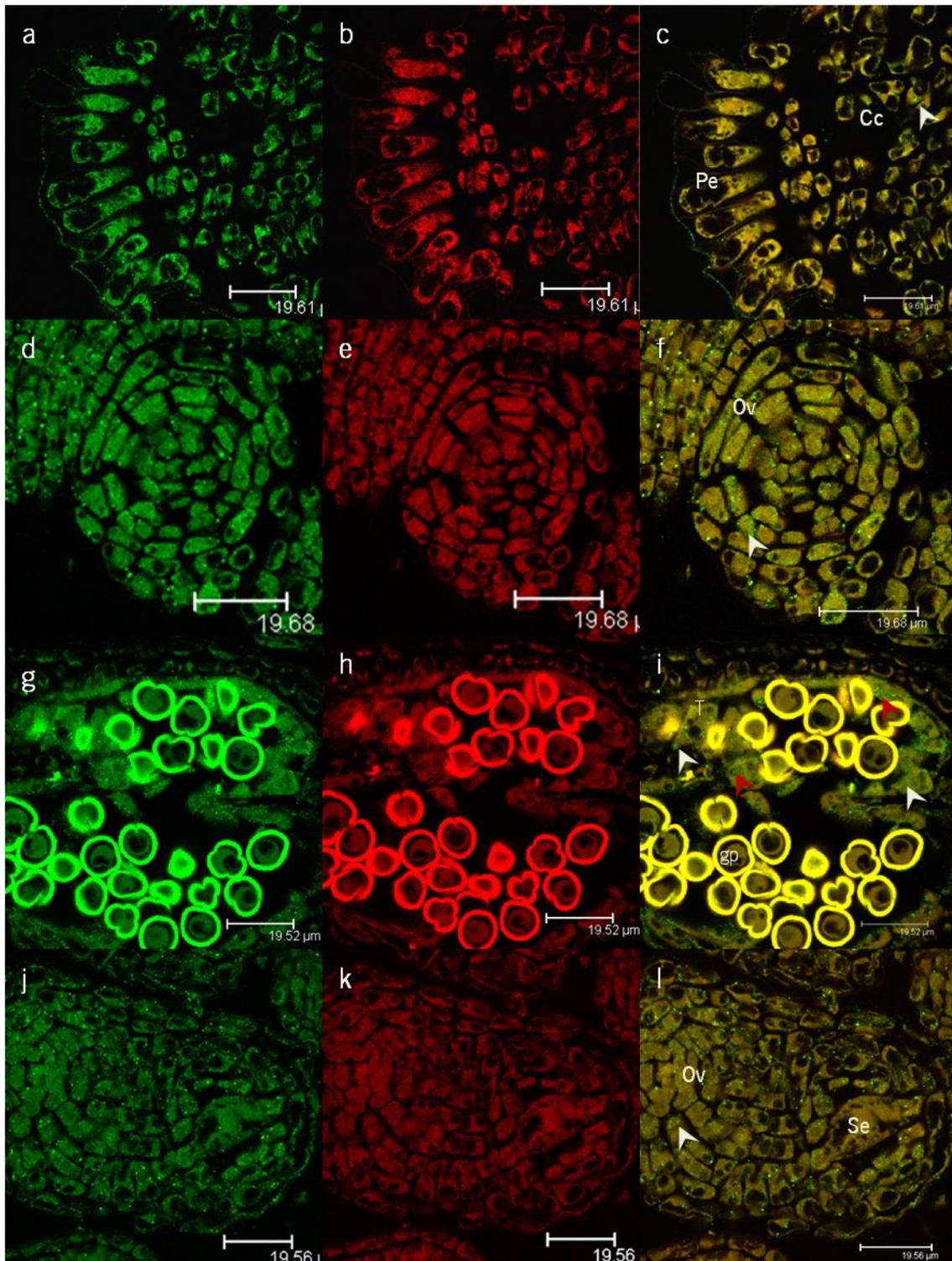


Figura 3.19 – Imunolocalização de cardosina B em seções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis* induzidas com dexametasona desde o início da germinação. Nas flores fechadas, a marcação de cardosina B foi detectada nas células corticais (Cc) e papilas estigmáticas (Pe) do estigma (a-c), nas células do óvulo (Ov) (d-f), nas células do tapete (T) e grãos de pólen (gp) nas anteras (g-i). Nas flores abertas, a marcação de cardosina B foi detectada nas células do óvulo (Ov) com exceção da zona do saco embrionário (Se) (j-l). As setas vermelhas indicam a marcação nos vacúolos, enquanto as setas brancas indicam a marcação no citoplasma das

células. A marcação foi detectada a verde (imagens à esquerda) e a autofluorescência a vermelho (imagens centrais). As imagens à direita correspondem à sobreposição das anteriores.

Os controlos das plantas Dex¹, nas quais foi realizada imunolocalização sem anti-B, não apresentavam a fluorescência verde relativa ao anticorpo secundário, tal como se verificou nas mesmas plantas onde se realizou a imunolocalização com anticorpo primário (Figura 3.19 e figura 3.20 coluna esquerda). Contudo, nos controlos de imunolocalização de plantas não induzidas foi possível observar alguma fluorescência verde nos espaços intercelulares e junto às paredes das celulares (Figura 3.20 coluna direita). Mais raramente observou-se essa marcação nos vacúolos das células e por vezes no citoplasma. Este tipo de marcação ocorreu nos estigmas mas principalmente nas anteras e ovários das flores fechadas (Figura 3.20 b, d, f). Nas flores abertas também foi possível observar este tipo de marcação nos espaços intercelulares junto às paredes celulares, e mais raramente no citoplasma das células dos ovários (Figura 3.20 h).

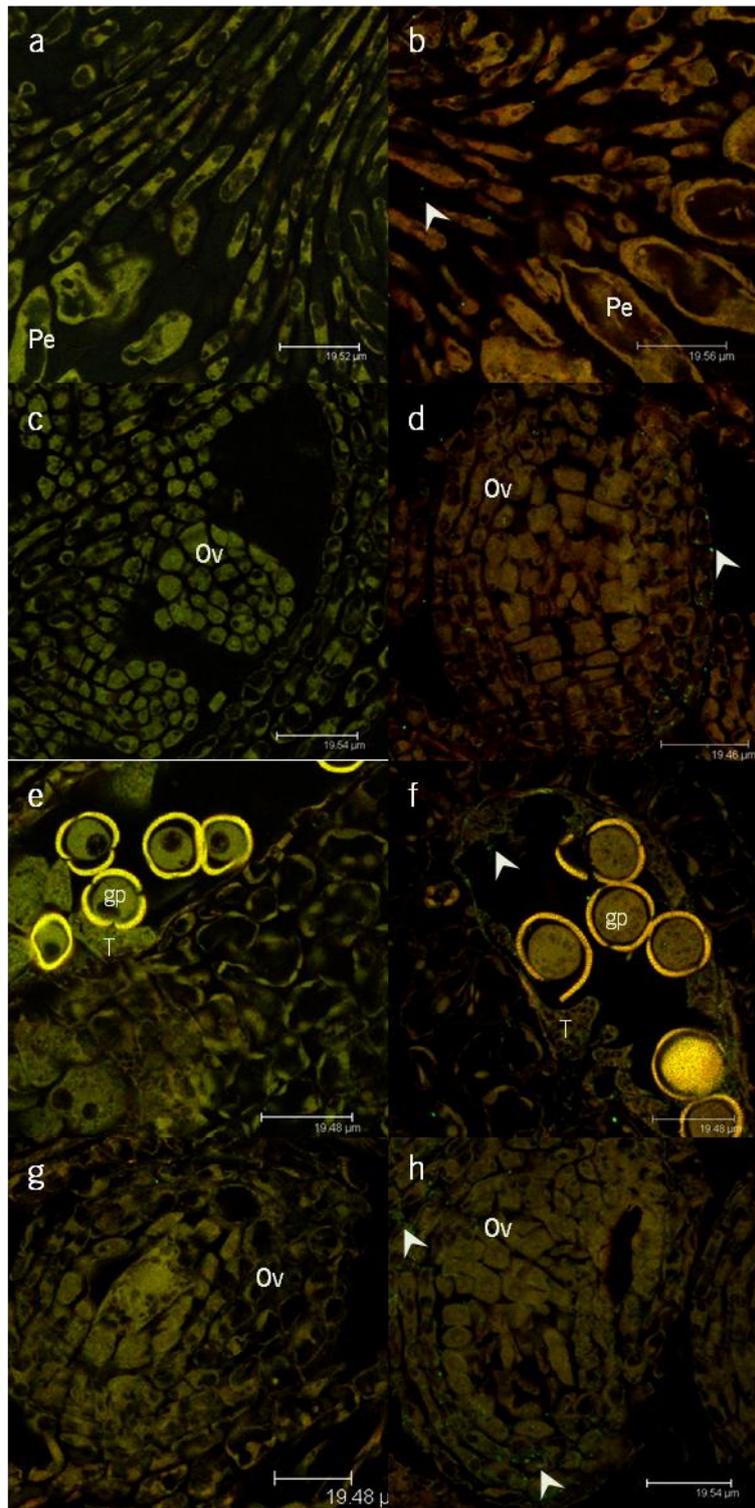


Figura 3.20 – Controlos de imunolocalização da cardosina B em secções de flores de linhas transgênicas de *Arabidopsis*. Coluna esquerda – plantas induzidas desde o início do desenvolvimento, secções sem anticorpo primário; coluna direita – plantas não induzidas, secções incubadas com anti-cardosina B e com Alexa Fluor® 488 associado ao anticorpo secundário. Foi possível ver-se nas imagens secções de estigmas, mostrando as papilas estigmáticas (Pe) (a-b), ovários com óvulos (Ov) (c-d) e anteras, evidenciando as células do tapete (T) e grãos de pólen (gp) (e-f), de flores fechadas (a-f) e ovários de flores abertas (g-h). Nas plantas não induzidas, nas flores fechadas, foi detectada alguma marcação (setas brancas) nos espaços intercelulares e, por

vezes, dentro das células, no estigma (b), no ovário (d), antera (f) e do ovário das flores abertas (h). As imagens apresentadas correspondem à sobreposição da fluorescência obtida com o Alexa 488, a verde, e a autofluorescência, a vermelho.

De modo a se evidenciar comparativamente a localização das cardosinas A e B nas flores de *Arabidopsis* transformadas com as respectivas construções, foi elaborada uma tabela, onde se pode verificar que a localização das cardosinas A e B é maioritariamente citoplasmática, com exceção das células do tapete, em ambos grupos de plantas transformadas com as construções que codificam para a cardosina A (induzidas desde o início e aquando do aparecimento das hastes) ou para a cardosina B (induzidas desde o início), e grãos de pólen, nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A induzidas desde o início (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Síntese e comparação da localização das cardosinas A e B nas plantas transgênicas induzidas desde o início (Dex I) e aquando do aparecimento das hastes florais (Dex H).

	Cardosina A		Cardosina B		
	Dex H	Dex I	Dex H	Dex I	
Estigma	citoplasma (marcação mais evidente nas células corticais abaixo das papilas estigmáticas)	citoplasma	cutícula e citoplasma	cutícula e citoplasma	Flor fechada
Papilas estigmáticas	Citoplasma	citoplasma	citoplasma	citoplasma	
Ovário	Citoplasma	citoplasma	citoplasma	citoplasma	
Óvulos	Citoplasma	citoplasma	citoplasma	citoplasma	
Antera	citoplasma e vacúolos das células do tapete	citoplasma e vacúolos das células do tapete	citoplasma	citoplasma e vacúolos das células do tapete	
Grãos de polén	Citoplasma	vacúolos	citoplasma	citoplasma	
Ovário	Citoplasma	citoplasma	citoplasma	citoplasma	Flor aberta
Óvulos	citoplasma (marcação mais evidente na zona nucelar)	citoplasma (marcação mais evidente na zona nucelar)	citoplasma (excepto zona nucelar)	citoplasma	

3.3.3. Estudos preliminares de imunolocalização intracelular da cardosina A

Foram iniciados estudos de imunolocalização por microscopia electrónica com anticorpos específicos para a cardosina A em flores de linhas de *Arabidopsis* a expressar cardosina A induzidas aquando do aparecimento das hastes florais, de forma a se poder visualizar a localização das cardosinas utilizou-se ouro coloidal conjugado com o anticorpo secundário. Como controlo utilizaram-se cortes sem o anticorpo primário.

Observaram-se cortes de ovário e anteras de flores abertas (Figura 3.21); contudo, os resultados obtidos vieram mostrar que de um modo geral a técnica necessita de optimização quer a nível de fixação (sem se perder a antigenicidade) quer a nível de concentração de anticorpos durante as incubações.

Observando os cortes obtidos não parecia haver uma localização preferencial da cardosina A nas células podendo este facto estar relacionado com a concentração de anticorpos durante a incubação. Ao nível dos feixes vasculares e das células do ovário a marcação foi ocasionalmente detectada (Figura 3.21A e B), sendo mais consistente quer nas ornamentações de exina dos grãos de pólen, quer no interior de microvacúolos (Figura 3.21C).

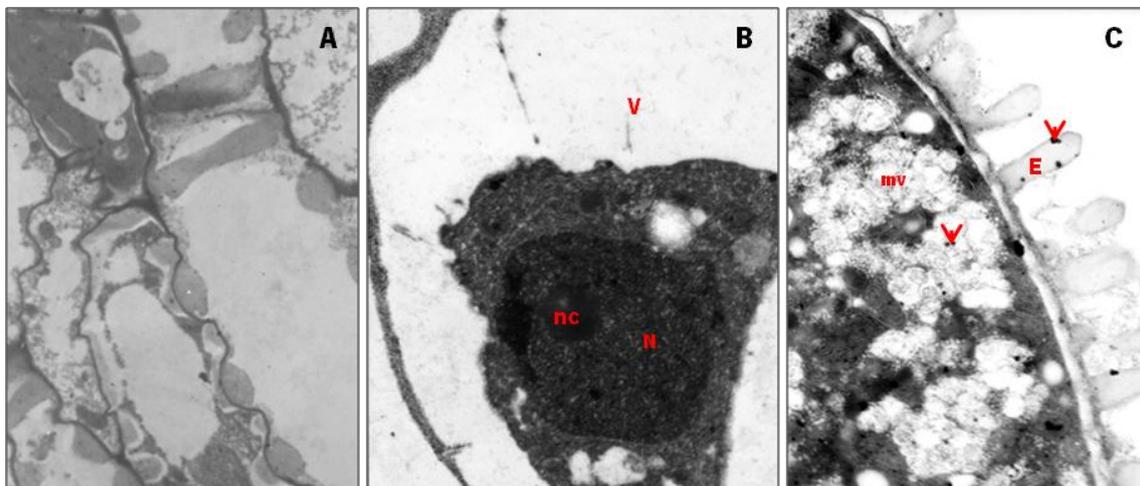


Figura 3.21 – Imunolocalização da cardosina A em secções de ovários e anteras de flores abertas de linhas transgénicas de *Arabidopsis*. (A) Feixe vascular onde é possível se observar os elementos de vaso do xilema (Ampliação: 7000X). (B) Célula do ovário, onde é possível observar-se o núcleo (N) com o nucléolo (nc) e o vacúolo (v) (Ampliação: 12000X). (C) Grão de pólen, onde se pode observar microvacuolos no seu interior (mc) e a exina (E) (Ampliação: 12000X). As setas vermelhas indicam a marcação correspondente ao ouro coloidal.

4. Discussão

As cardosinas A e B acumulam-se nas flores e sementes de *Cynara cardunculus*. Estas duas cardosinas apresentam uma elevada homologia, no entanto, foram localizadas em diferentes locais da flor de cardo, a cardosina A foi localizada nos vacúolos de armazenamento proteico das papilas estigmáticas (Ramalho-Santos *et al*, 1997), enquanto a cardosina B foi localizada na matriz extracelular do tecido de transmissão (Vieira *et al*, 2001). Estas proteínas tornaram-se, por isso, um modelo apelativo para o estudo das suas funções e trajecto intracelular.

As cardosinas A e B foram já estudadas em diferentes sistemas devido à dificuldade em as estudar na planta nativa, tendo sido estudadas em tecido caloso de cardo (planta nativa) (Oliveira *et al*, 2010), e em sistemas heterólogos como a planta do tabaco e *Arabidopsis* (Soares da Costa, 2010). No entanto, até este trabalho ainda não se tinha realizado a caracterização fenotípica em linhas estáveis em flores de *Arabidopsis*, assim como não fora estudada a expressão e localização das cardosinas nas mesmas plantas.

4.1. Caracterização fenotípica das linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*

Foram já descritos casos em que a expressão ectópica de diferentes genes poderão afectar o desenvolvimento das plantas em que são sobreexpressos. A expressão ectópica da proteinase aspártica PCS1 causa infertilidade masculina por impedir a deiscência das anteras (Ge *et al*, 2005). Também a sobreexpressão do gene *CDS10* (At2g28010) sob o controlo do promotor 35S na planta ornamental *Pelargonium* aumenta o número de ramificações e causa nanismo (Chabannes *et al*, 2009). Assim, como resposta à hipótese da expressão ectópica das cardosinas poder afectar de alguma forma o desenvolvimento das plantas transformadas, surgiu a necessidade de se realizar uma caracterização fenotípica das linhas de *Arabidopsis thaliana* transformadas com as construções que possuem os genes das cardosinas A e B.

Nesse sentido, num estudo preliminar, mediu-se o comprimento das raízes principais e o comprimento da zona pilosa das raízes secundárias, o tamanho dos cotilédones e siliquas, e altura das hastes florais principais. Contabilizou-se também, o número de raízes laterais, hastes florais principais, flores e siliquas. Os resultados deste primeiro ensaio revelaram um melhor desenvolvimento das plantas *wild type* comparativamente às plantas transformadas, tanto em relação às induzidas como às não induzidas, em todos os parâmetros, levantando a hipótese

que a inserção de uma construção por si só, poderá de alguma forma atrasar o desenvolvimento das plantas. No entanto, observando a Tabela 3.1 (capítulo resultados) podemos constatar que não se verificou, entre as plantas transformadas (tanto induzidas como não induzidas) um grupo de plantas com valores máximos (em média) em todos os parâmetros. Assim, não foi possível inferir com certeza sobre o grupo de plantas transformadas que melhor se desenvolve neste primeiro ensaio. No entanto, as plantas transformadas com as construções que codificam para as cardosinas A e B induzidas (A+ e B+) parecem ter tido um desenvolvimento floral mais acelerado em relação às não induzidas (A- e B-). Este dados vieram sugerir, que ao contrário do que se esperava, a sobreexpressão das cardosinas A e B em *Arabidopsis* não influencia negativamente o seu desenvolvimento. De um modo geral, as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A parecem ter um melhor desenvolvimento, revelando que a inserção da construção da cardosina A nas plantas utilizadas não despoleta um atraso no desenvolvimento das plantas como a inserção da construção da cardosina B. Entre as plantas transformadas e induzidas parece ter havido um melhor desenvolvimento nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A (A+), com excepção no número de raízes laterais e zona pilosa.

Com base nos resultados do ensaio preliminar realizou-se um segundo ensaio, no qual se avaliou apenas alguns parâmetros – comprimento das raízes, número das raízes laterais e número total de flores.

Estudos anteriores postulam que a dexametasona não afecta o desenvolvimento da *Arabidopsis*, no entanto, deve ser dissolvida em DMSO (Moore *et al*, 2006), como tal, na tentativa de eliminar o possível efeito de stresse provocado pelo DMSO, as plantas controlo (plantas *wild type* e plantas transformadas não induzidas) foram regadas com água contendo DMSO a 1%. Verificou-se que tal como no primeiro ensaio, as plantas *wild type* apresentam um melhor desenvolvimento em relação às plantas transgénicas, reforçando a ideia de que as plantas *wild type* têm um melhor desenvolvimento que as plantas transformadas, quer induzidas, quer não induzidas. Dentro das plantas transgénicas, as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A apresenta um maior comprimento da raiz e um maior número de flores, no entanto, as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B apresentam um maior número de raízes laterais, tal como no primeiro ensaio. Estes resultados juntamente com o facto das plantas *wild type* terem um crescimento mais desenvolvido em relação às plantas transformadas, sugerem que as plantas têm um

crescimento afectado pela introdução de uma construção ao seu genoma nativo, no entanto, dentro deste grupo de plantas transgénicas, as plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A sofrem um atraso no desenvolvimento menor que as plantas transformadas com a cardosina B. Dentro das plantas transformadas, as plantas que expressam as cardosinas parecem corrigir um pouco esse atraso no desenvolvimento em relação às *wild type* já que apresentam valores mais próximos das plantas *wild type* nos diferentes parâmetros, embora esses valores sejam mais baixos.

Tratando-se este estudo de um ensaio preliminar deve ser repetido de forma a confirmar os resultados seguindo as condições do segundo ensaio, já que neste as plantas controlo foram regadas com DMSO a 1%, pois as condições impostas pelo laboratório não permitiram a utilização de um número de plantas elevado. Para além deste estudo, realizando uma análise fenotípica baseada em momentos chave do desenvolvimento das plantas (Boyes *et al*, 2001), avaliando o tempo necessário para a emergência da radícula, dos cotilédones, desenvolvimento da roseta, aparecimento dos gomos florais e síliquas, poderia complementar estes resultados. Deste modo, seria possível perceber se o menor desenvolvimento revelado pelas linhas transgénicas se deve a um atraso na progressão dos estados de desenvolvimento.

4.2. Expressão e localização das cardosinas A e B nas flores

De forma a inferir sobre a expressão das cardosinas A e B nas plantas transgénicas, foi realizada uma coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter *GUS* nas flores. Tal como esperado, as flores fechadas e as flores abertas das plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A induzidas com Dex apresentavam coloração azul, sugerindo que a houve expressão do gene repórter *GUS* e conseqüentemente expressão da cardosina A, já que a expressão do sistema utilizado neste estudo é bidireccional, como explicado anteriormente no capítulo da introdução. No caso das plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B, não se verificou a mesma coloração azul nas flores fechadas e nas flores abertas, apenas metade apresentavam coloração azul, contudo, estes resultados podem dever-se a alguma falha na técnica de detecção da actividade da β -glucuronidase, já que quando efectuada imunolocalização houve detecção de marcação. No

entanto, é ainda necessário validar estes resultados através de técnicas de Western-blotting e RT-PCR.

O promotor presente nas construções usadas neste trabalho, como referido anteriormente, foi o pOp6 que é um promotor quimérico com o promotor mínimo constitutivo CaMV 35S, e por isso, é capaz de permitir a expressão em toda a planta. Deste modo, era esperada uma expressão das cardosinas A e B em todos os tecidos das plantas transformadas e induzidas, o que se verificou, já que foi realizada imunolocalização das cardosinas A e B, e foi detectada marcação respeitante às diferentes cardosinas em todos os tecidos observados. No entanto, apesar de se observar uma marcação generalizada em todos os tecidos, foi observada marcação preferencial em alguns tecidos em detrimento de outros, em ambos grupos de plantas transformadas com as construções que codificam para a cardosina A ou cardosina B.

Conhecem-se até à data 3 proteinases aspárticas de *Arabidopsis* que se expressam nas flores, sendo elas a A1, A2 e A3. É também conhecido que as APs A1 e A3 expressam-se nas pétalas e carpelos, e também nas camadas exteriores da antera no início do desenvolvimento floral, enquanto a A2 tem uma expressão fraca no tecido de transmissão (Chen *et al*, 2002). No entanto, nos contolos, não se verificou marcação em nenhum grupo de plantas transformadas com as construções que codificam para a cardosina A ou B, revelando que os anticorpos usados contra as cardosinas não reconhecem as proteinases aspárticas endógenas presentes nas flores de *Arabidopsis*.

Em estudos anteriores, a cardosina A foi localizada nas papilas estigmáticas da flor de cardo (Ramalho-Santos *et al*, 1997). No presente estudo, apesar de se ter localizado cardosina A nas papilas estigmáticas, a localização mais evidente foi observada na nas células corticais do estigma situadas abaixo das papilas estigmáticas das flores de *Arabidopsis thaliana*. Esta marcação foi visualizada nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A induzidas desde o início e induzidas aquando o aparecimento das hastes principais. Ainda nestas plantas foi possível observar-se marcação no citoplasma das células dos ovários, incluindo nos óvulos, quer nas flores abertas ou fechadas. Também foi observada marcação referente à cardosina A na antera, principalmente nas células do tapete. Nestas foi observada marcação nos vacúolos e citoplasma nas plantas induzidas aquando o aparecimento das hastes e nos vacúolos nas plantas induzidas desde o início. Também nos grãos de pólen se verificou uma diferença na localização da cardosina A nas plantas induzidas aquando o aparecimento das hastes em relação às plantas induzidas desde o início, tendo sido observada marcação no

citoplasma e nos vacúolos respectivamente. Para além destas diferenças na localização da cardosina A nas plantas induzidas desde o início e induzidas aquando o aparecimento das hastes, foi também visível uma marcação ligeiramente mais acentuada em todos os estádios, das plantas induzidas a meio do seu desenvolvimento em relação às induzidas desde o início. Este conjunto de resultados sugere que deverá haver um mecanismo de controlo da sobreexpressão da cardosina na planta da *Arabidopsis*, ou então, as plantas, apesar de transformadas com a construção que codifica para a cardosina A, não expressando desde o início, não sentirão um possível stress causado pela sobreexpressão, sendo assim capazes de expressar melhor a cardosina quando é adicionado o glucocorticoide (Dexametasona) às plantas.

Quanto às plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina B induzidas (quer desde o início do desenvolvimento, quer aquando do aparecimento das hastes principais), nas flores fechadas verificou-se marcação no citoplasma do estigma, e também na cutícula que reveste as papilas estigmáticas, assim como no citoplasma das células dos ovários, incluindo os óvulos. Nas anteras para além de se observar marcação no citoplasma das células, incluindo no citoplasma dos grãos de pólen, também se observou, nas plantas induzidas desde o início, em vacúolos das células do tapete, como se verificou também nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A. Ao contrário do descrito por Figueiredo e colaboradores (2006) nas flores de cardo, nas flores abertas de *Arabidopsis* não se observou marcação na zona do nucelo dos óvulos em flores de *Arabidopsis*. No entanto, é necessário ter em conta que é muito difícil fazer um paralelismo de estádios de desenvolvimento dos óvulos das flores de *Arabidopsis* e de cardo, podendo ser este o motivo da diferença de expressão da cardosina B nas duas plantas. Por outro lado, a planta de *Arabidopsis* tem mecanismos de controlo que podem interferir com a expressão de determinados genes, mesmo utilizando um promotor constitutivo. A marcação de cardosina B observada, é também oposta à que se verificou nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A, onde se observou uma marcação mais evidente na zona do nucelo dos óvulos das flores abertas, evidenciando que a cardosina A, apesar de muito semelhante estrutural e filogeneticamente à cardosina B, pode ter mecanismos de actuação e funções diferentes.

A cardosina B, embora menos seja menos abundante que a cardosina A nas flores de cardo, tem uma actividade proteolítica maior que a cardosina A, assim como uma especificidade de substratos mais abrangente (Ramalho-Santos *et al*, 1996), estes factos podem levar para

uma sensibilidade diferente da planta *Arabidopsis* às diferentes cardosinas, levando a níveis e padrões de expressão diferentes nas plantas transgênicas.

Para além do interesse na sua função, as cardosinas A e B têm sido estudadas no sentido de elucidar as suas vias de trânsito. Em estudos anteriores, a cardosina A foi apontada como sendo vacuolar em cardo (Ramalho-Santos *et al*, 1997), mas também em sistemas heterólogos como *Arabidopsis* e tabaco (Duarte, 2008 e Pereira, 2008). Por outro lado a cardosina B foi inicialmente detectada na matriz extracelular do tecido de transmissão (Vieira *et al*, 2001) tendo sido mais recentemente observada a nível vacuolar em tecidos sujeitos a morte celular programada, no ovário de cardo (manuscrito em preparação). Estudos recentes mostraram que quando expressa em sistemas heterólogos, a cardosina B é vacuolar podendo ser secretada em determinadas circunstâncias (Soares da Costa, 2009). Desta forma foi sugerido que a acumulação na parede pode ser a exceção e não a regra para a cardosina B (Soares da Costa *et al*, 2010). O mesmo foi observado em *Arabidopsis*, em que dependendo do tecido a localização intracelular de ambas as cardosinas varia: em sementes a forma madura da cardosina B é secretada (Oliveira, 2009); já nas folhas a mesma cardosina é vacuolar e também secretada. No presente trabalho ambas as cardosinas parecem acumular-se, de uma forma geral, no citoplasma nas flores de *Arabidopsis*. No entanto, nas plantas transformadas com a construção que codifica para a cardosina A foi possível observar-se cardosina A, nos vacúolos e citoplasma das células do tapete, em ambos os grupos de plantas induzidas no início do desenvolvimento e aquando do aparecimento das hastes florais, e também nos vacúolos dos grãos de pólen nas plantas induzidas desde o início e não nas plantas induzidas aquando do aparecimento das hastes florais, sugerindo que neste caso a proteína possa ser vacuolar, mas quando a indução da expressão é feita a meio do desenvolvimento das plantas, não há o tempo necessário para que a proteína atinja o seu destino final. O mesmo parece acontecer com a cardosina B nas células do tapete, já que também foi possível localizar-se a cardosina B nos vacúolos das células do tapete da antera, ambos os casos em flores fechadas. No entanto o grau de desenvolvimento da antera, assim como o momento da indução, poderão também estar relacionados com as diferenças nas localizações de ambas as cardosinas, não descartando por isso a hipótese de ambas se poderem comportar como sendo vacuolares nestes órgãos das flores de *Arabidopsis*. Resumindo, de um modo geral, o direccionamento das cardosinas parece estar dependente do tipo de célula e tecido em que estão a ser expressas. Há uma especialização das vias de trânsito que de certa forma pode ser responsável pela diferente

localização observada nos diferentes tipos de células. No entanto, ainda muito trabalho há ainda a fazer de forma a corroborar estes resultados e a elucidá-los.

Em trabalhos futuros, pretendem-se elaborar construções com os promotores nativos das cardosinas e posteriormente transformar *Arabidopsis*. Estes promotores foram já isolados e testados por Pimentel e colaboradores (2007). Desta forma poder-se-á estudar a expressão das cardosinas sobre a acção dos respectivos promotores e estabelecer comparações com os resultados obtidos com o promotor constitutivo.

5. Conclusão

Este trabalho foi importante na medida em que trouxe novos conhecimentos no estudo das cardosinas utilizando a *Arabidopsis thaliana* como sistema heterólogo.

Com este trabalho podemos confirmar que a *Arabidopsis* é um modelo capaz de expressar estavelmente as cardosinas A e B, sem que seja afectada a viabilidade e fertilidade das plantas. No entanto, o desenvolvimento é afectado, sendo que as plantas *wild type* possuem um desenvolvimento mais rápido em relação às plantas transformadas. Apesar deste atraso no desenvolvimento, as plantas transformadas desenvolvem-se normalmente e produzem descendência viável. De modo a complementar este estudo seria interessante efectuar uma análise fenotípica baseada em momentos chave do desenvolvimento das plantas, avaliando o tempo necessário para a emergência da radícula, dos cotilédones, desenvolvimento da roseta, aparecimento dos gomos florais e silíquas.

A expressão das cardosinas foi avaliada recorrendo à coloração histoquímica para detecção da actividade do gene repórter *GUS* nas flores e imunolocalização associada à microscopia óptica e electrónica. Estes resultados revelaram que as cardosinas eram bem expressas nas flores. Através da microscopia confocal podemos inferir sobre a localização das cardosinas. Estas apesar de expressas por toda a flor, apresentaram uma localização preferencial tanto a nível tecidular como intracelular. Assim, no que se refere à localização tecidular e intracelular pode-se constatar que as cardosinas têm padrões de acumulação distintos da planta nativa, sendo detectadas ao nível do citoplasma. É de salientar que neste estudo foi utilizado um promotor constitutivo, o que poderá justificar as diferenças de distribuição das cardosinas na flor.

Estudos futuros utilizando os promotores nativos a direccionar a expressão das cardosinas poderão ser elucidativos quer dos seus possíveis papéis fisiológicos, quer das vias de trânsito seguidas por estas proteínas.

6. Bibliografia

Boyes D C, Zayed A M, Ascenzi R, Mccaskill A J, Hoffman N E, Davis K R, Görlach J

(2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13: 1499-1510

Chabannes M, Marazuela E, Borja M (2009) *XXIIIrd International Eucarpia symposium, Section Ornamentals Colourful Breeding and Genetics* Leiden, Pays-Bas

Chen X, Pfeil J E, Gal S (2002) The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed. *Eur. J. Biochem.*, 269: 4675-4684

Chen F, Foolad M R (1997) Molecular organization of a gene in barley which encodes a protein similar to aspartic protease and its specific expression in nucellar cells during degeneration. *Plant Mol. Biol.*, 35: 821-831

Cooper J B (2002) Aspartic proteinases in disease: A structural perspective. *Curr. Drug Targets*, 3: 155-173

Craft J, Samalova M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I (2005) New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 899-918

Davies D R (1990) The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 19: 189-215

Drews G R, Yadegari R (2002) Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Rev. Genet.* 36: 99-124

Duarte P, Figueiredo R, Pereira S, Pissarra J (2006) Structural characterization of the stigma-style complex of *Cynara cardunculus* (Asteraceae) and immunolocalization of cardosins A and B during floral development. *Can J. Bot* 84(5): 737-749

Duarte P, Pissarra J, Moore I (2008) Processing and trafficking of a single isoform of the aspartic proteinase cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta*, 227: 1255–1268

Dunn B M (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem. Rev.*, 102: 4431-4458

Egas C, Lavoura N, Resende R, Brito R M M, Pires E, Pedroso de Lima M C, Faro C (2000) The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *J. Biol. Chem.*, 275(49): 38190-38196

Figueiredo R, Duarte P, Pereira S, Pissarra J (2006) The embryo sac of *Cynara cardunculus* – ultrastructural of the development and localization of the aspartic proteinase cardosin B. *Sex, Plant Reprod.* 19: 93-101

Ge X, Dietrich C, Matsuno M, Li g, Berg H, Xia Y (2005) An *Arabidopsis* aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO Rep.* 6(3): 282-288

Goto K (1996) Molecular and genetic analyses of flower homeotic genes os *Arabidopsis*. *J. Biosci.* 21(3):369-378

Khan A R, Khazanovich-Bernstein N, Bergmann E M, James N G (1999) Structural aspects of activation pathways of aspartic protease zymogens and viral 3C protease precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 96: 10968-10975

Martilla S, Jones B L, Mikkonen A (1995) Differential localization of two acid preteinases in germinating barley (*Hordeum vulgare*) seed. *Physiol. Plantarum*, 93: 317-327

Moore I, Galweiler L, Grosskopf D, Schell J, Palme K (1998) A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 376-381

Moore I, Samalova M, Kurup S (2006) Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J.*, 45: 651-683

Mutlu A, Gal S (1999) Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiol. Plantarum*, 105: 569-576

Oliveira A (2009) Expressão da cardosina B nas fases iniciais do desenvolvimento pós-embriónico: um estudo comparativo entre *Cynara cardunculus* e *Arabidopsis thaliana*. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Oliveira A, Pereira C, Soares da Costa D, Teixeira J, Fidalgo F, Pereira S, Pissarra J (2010) Characterization of aspartic proteinases in *C. cardunculus* L. callus tissue for its prospective transformation. *Plant Sci.*, 178: 140-146

Pereira C S, Soares da Costa D, Pereira S, Nogueira F M, Albuquerque P M, Teixeira J, Faro C, Pissarra J (2008) Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases. *Protoplasma*, 232: 203-213

Pereira C (2008) Determinantes vacuolares da cardosina A. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Pimentel C, Van Der Straeten D, Pires E, Faro C, Rodrigues-Pousada C (2007) Characterization and expression of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS J.*, 274: 2523-2539

Pissarra J, Pereira C, Soares da Costa D, Figueiredo R, Duarte P, Teixeira J, Pereira S (2007) From flower to seed germination in *Cynara cardunculus*: a role for aspartic proteinases. *Int. J. Plant Dev. Biol.*, 274-281

Ramalho-Santos M, Veríssimo P, Faro C, Pires E (1996) Action on bovine α_{s1} -casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L.. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1297: 83-89

Ramalho-Santos M, Pissarra J, Veríssimo P, Pereira S, Salema R, Pires E, Faro C J

(1997) Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in stigmatic papillae of *Cynara cardunculus*. *Planta*, 203: 204-212

Ramalho-Santos M, Veríssimo P, Cortes L, Samyn B, Van Beeumen J, Pires E, Faro C

(1998) Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur. J. Biochem*, 255: 133-138

Rawlings N D, Morton F R, Kok C Y, Kong J, Barret A J (2008) *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 36: 320-325

Sampaio G (1988) Flora Portuguesa, 3ª edição. Instituto Nacional de Investigação Científica, Porto.

Sarmiento A C, Lopes H, Oliveira C S, Vitorino R, Samyn B, Sergeant K, Debyser G, Van Beeumen J, Domingues P, Amado F, Pires E, Domingues R M, Barros M T (2009) Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230: 429-439

Smyth D R, Bowman J L, Meyerowitz L M (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2:755-767

Simões I, Faro C (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 271: 2067-2075

Simões I, Mueller E V, Otto A, Bur D, Cheung A Y, Faro C, Pires E (2005) Molecular analysis of the interaction between cardosin A and phospholipase D α : Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains. *FEBS J.*, 272: 5786-5798.

Simpson R J (2007) Cold Spring Harb. Protoc; doi:10.1101/pdb.ip13

Soares da Costa D (2009) Cardosin B expression and biosynthetic pathways in *Cynara* sp. And in heterologous systems. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Soares da Costa D, Pereira S, Moore I, Pissarra (2010) Dissecting cardosin B trafficking pathways in heterologous systems. *Planta*, 232: 1517-1530

Somerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. rev., Genetics*, 3: 883-889

Teurauchi K, Asakura T, Ueda H, Tamura T, Tamura K, Matsumoto I, Misaka T, Hara-Nishimura K, Abea K (2005) Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J.Plant Physiol.*, 163(8): 856-862

Tormankangas K, Hadlington J, Pimpl P, Hillmer S, Brandizzi F, Teeri T, Denecke J (2001) A vacuolar sorting domain may also influence the way which proteins leave the endoplasmatic reticulum. *The Plant Cell*, 13: 2021-2032

Van der Hoorn R A L (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59: 191-223

Veríssimo P, Faro C, Moir A J G, Lin Y, Tang J, Pires E (1995) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers os *Cynara cardunculus* L. *Eur. J. Biochem.* 235: 762-768

Vieira M, Pissarra J, Veríssimo, Castanheira P, Costa Yael, Pires E, Faro C (2001) Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, na aspartic proteinase accumulations extracellular in the transmitting tissue os *Cynara cardunculus* L. *Plant Mol.r Biol.* 45: 529-539