

## Superexpressão do Gene *Alt<sub>SB</sub>*, Aluminum Tolerance *Sorghum Bicolor*, em Plantas Transgênicas de Milho

Andréa A. Carneiro<sup>2</sup>, Monalisa H. Carneiro<sup>1</sup>, Jurandir V. Magalhães<sup>2</sup>, Newton Portilho Carneiro<sup>2</sup> e Claudia T. Guimarães<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista McKnight Foundation [monalisacarneiro@yahoo.com.br](mailto:monalisacarneiro@yahoo.com.br), <sup>2</sup>Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 CEP 35701-1000, SeteLagoas-MG. [jurandir@cnpmc.embrapa.br](mailto:jurandir@cnpmc.embrapa.br), [newtonc@cnpmc.embrapa.br](mailto:newtonc@cnpmc.embrapa.br), [claudia@cnpmc.embrapa.br](mailto:claudia@cnpmc.embrapa.br), [andreac@cnpmc.embrapa.br](mailto:andreac@cnpmc.embrapa.br)

Palavras-chave: *Zea mays*, biobalística, transgênicos, estresse, alumínio.

O Brasil é um país eminentemente agrícola, tendo esse setor um forte impacto na sustentabilidade ambiental e sócio-econômica nacional. Em 2007 foram produzidas 42.000.000 toneladas de milho no território brasileiro. Apesar dos elevados patamares de produção agrícola, recentemente alcançados, a produtividade desta cultura encontra-se aquém do potencial genético dos materiais disponíveis, podendo ser incrementada para atender às diferentes demandas dos produtores rurais. Dentre os fatores que contribuem para a baixa produtividade do milho, destaca-se a toxidez causada pelo alumínio ( $Al^{+3}$ ). Os rendimentos agrícolas são substancialmente reduzidos pela toxicidade de  $Al^{+3}$  em solos ácidos, os quais representam 68% ou 250 milhões de hectares do território brasileiro e, aproximadamente 50% das terras agricultáveis do planeta. O efeito fitotóxico do Al advém de formas monoméricas parcialmente protonadas de  $Al^{+3}$  liberadas na solução desses solos a partir de compostos como  $Al(OH)_3$  e silicatos de Al (Martin, 1992). O ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica desse mineral e o sintoma mais visível do estresse é a inibição do crescimento do sistema radicular (Ryan et al., 1992; Wenzl et al., 2001). Sob níveis tóxicos de Al no solo, as raízes das plantas paralisam seu desenvolvimento e tornam-se incapazes de explorar camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de nutrientes, aumentando a susceptibilidade à seca e reduzindo a produção.

As plantas possuem diferentes mecanismos de tolerância à presença de níveis tóxicos de Al no solo. Tais mecanismos podem ser classificados em mecanismos de exclusão e de tolerância interna, cuja principal diferença reside no sítio de detoxificação do alumínio, apoplasto ou simplasto, respectivamente. Dentre as formas de detoxificação externa de Al uma das mais estudadas é a exsudação de ácidos orgânicos pela raiz (Ma, 2000; Ryan et al., 2001; Kochian et al., 2004) ou de compostos fenólicos (Kochian et al., 2004). No entanto, mecanismos de efluxo de fosfato (Pellet et al., 1996), secreção de proteínas que se ligam aos íons de Al (Basu et al., 1997), permeabilidade seletiva da membrana plasmática para reduzir a captura de Al para o citosol (Archambault et al., 1996), controle do pH da rizosfera mediado pelas raízes (Degenhardt et al., 1998) têm sido identificados como envolvidos na tolerância ao Al. A detoxificação interna de alumínio tem sido pouco estudada, mas inclui os mecanismos de captura dos íons tóxicos para o interior do vacúolo (Zheng et al., 2005) ou processos metabólicos que quelam o Al no citosol (Kochian, 1995).

A tolerância ao alumínio tem sido amplamente estudada em gramínea, com destaque a dois genes clonados em trigo (Sasaki et al., 2004) e em sorgo (Magalhães et al., 2007). O gene *ALMT1* codifica um transportador de malato ativado pelo Al, conferindo tolerância ao alumínio em trigo. Delhaize et al. (2004)

demonstraram que plantas transgênicas de cevada superexpressando *ALMT1* apresentaram um aumento significativo na taxa de exsudação de malato, com conseqüente aumento da tolerância ao alumínio. O segundo gene de tolerância ao alumínio (*Alt<sub>SB</sub>*) foi clonado em sorgo por pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, em parceria com equipes internacionais, dedicados ao estudo genético, fisiológico e molecular da tolerância ao Al em gramíneas (Magalhães et al., 2007), trata-se de um membro da família MATE, responsável pela extrusão de múltiplas drogas e compostos tóxicos. Este gene codifica um transportador de membrana, responsável pelo efluxo de citrato, ativado em presença do Al<sup>3+</sup>. Plantas de *Arabidopsis* transformadas com o gene *Alt<sub>SB</sub>* apresentaram um aumento da tolerância ao alumínio e da exsudação de citrato, em comparação com plantas não transgênicas (Magalhães et al., 2007). Tais resultados evidenciam que esses genes podem ser utilizados, via transgenia, para aumento da tolerância ao alumínio e conseqüente maior adaptabilidade de plantas aos solos ácidos.

O gene *Alt<sub>SB</sub>* controlado pelo promotor da Ubiquitina de milho e pelo terminador NOS de *Agrobacterium* foi introduzido no genoma do híbrido de milho HiII via biobalística de acordo com Frame *et al.* (2000) e Carneiro et al (2004). Resumidamente, na produção de milho transgênico via biobalística, embriões imaturos, de 1,0 a 1,5 mm foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 30 dias em meio básico N6I (Chu et al., 1975) suplementado com 2 mg/L 2,4-D. Durante o bombardeamento foram utilizadas micropartículas de tungstênio aceleradas através de um aparelho movido à hélio. Um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuspensando 60 mg tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) em 1 ml de uma solução 50% glicerol estéril. Uma quantidade de 5 µg de DNA da construção gênica Ubiq:: *Alt<sub>SB</sub>* :: NOS de foi juntamente precipitados sobre 50 µl da solução estoque de tungstênio. As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspensadas em 60 µl de etanol 100%. Sete microlitros, desta solução, foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Tais membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse utilizando 1100 psi de pressão de gás hélio e os explantes foram posicionadas à 6 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidas constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg). A seleção de plantas transgênicas foi iniciada sete dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio básico N6S suplementados com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale. Calos foram subcultivados a cada 10 dias em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (6 a 9 mg/L). Para a regeneração, calos embriogênicos foram transferidos inicialmente para meio RM, suplementado com 6 mg/L glufosinato de amônia, até a maturação dos embriões. Em seguida, os embriões maduros foram germinados em meio MS, suplementado com 3 mg/L de glufosinato de amônia, à 26°C em luz (16 horas). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Foram regeneradas 20 plantas de milho em meio contendo glufosinato de amônia, sendo sete eventos diferentes. DNA genômico foi isolado dos sete eventos utilizando-se o método de Saghai-Marroof et al. (1984). A presença da construção gênica, Ubiq:: *Alt<sub>SB</sub>* :: NOS, foi confirmada através da reação de amplificação por PCR dos genes *Alt<sub>SB</sub>* e *bar*. Um fragmento de 407 pb da região codante do gene *bar* foi amplificada usando os primers específicos BAR forward 5'AGA AAC CAC GTC ATG CC3' e BAR reverse 5'TGC ACC ATC GTC AAC CAC3'; um fragmento de 788 pb do gene *Alt<sub>SB</sub>* foi amplificado usando os primers JL57 5'GTG CTG GAT CCG ATC CTG

AT3' e JL58 5' CAC TGC CCG AAG AAA CTT CCA3' (Figura 1). Cada 25 µl de reação continham tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada um dos *primers*, 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando-se um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos, anelamento, a 60°C, por 40 segundos e extensão, a 72°C, por 90 segundos, seguidos de uma extensão final, a 72°C, por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 volts por 2 horas, em gel de agarose 0,8 % utilizando-se tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

Plantas transgênicas se encontram em casa-de-vegetação em fase de maturação dos grãos. Estes serão futuramente testados em solução hidropônica contendo diferentes concentrações de Al<sup>+3</sup> para verificação da tolerância a este tipo de estresse abiótico.

### Referências bibliográficas:

1. ARCHAMBAULT, D. J.; ZHANG, G.; TAYLOR, G. J. 1996. *Plant Physiol*, 112: 1471-1478.
2. BASU, U; McDONALD, J. L.; ARCHAMBAULT, D. J.; GOOD, A. G.; BRIGGS, K. G.; AUNG, T.; TAYLOR, G. J. *Plant Soil*, v. 196, p. 283-8, 1997.
3. CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. *Embrapa Milho e Sorgo*, 32, 44 p., 2004
4. CHU C; WANG CC; SUN CS; HSU C; YIN KC; CHU CY; BI FY. *Sci. Sin.* 18:659-668, 1975
5. DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. *Proc. Natl. Academic Science*, v.101, p.15249-15254, 2004.
6. DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. *Plant Physiol*, v. 117, p. 19-27, 1998.
7. FRAME, BR; ZHANG, H; COCCIOLONE SM, SIDORENKO, LV; DIETRICH, CR; PEGG, SE; ZHEN, S; SCHNABLE, PS; WANG, K. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 36:21-29, 2000
8. KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, A. A. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 55 p. 459-93, 2004.
9. KOCHIAN, L.V. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, v.46, p.237-260, 1995.
10. MA, J.F.; SHEN, R.; ZHAO, Z.; WISSUWA, M.; TAKEUCHI, Y.; EBITANI, T.; YANO, M. 2002. *Plant Cell Physiol*. 43:652-659.
11. MAGALHAES JV; LIU J; GUIMARAES CT; LANA UGP, ALVES VMC; WANG YH; SCHAFFERT RE, HOEKENGA O A; PINEROS MA, SHAFF JE; KLEIN PE; CARNEIRO NP; COELHO CM; TRICK AN; KOCHIAN LV. *NATURE GENETICS*. 39:1156-1161, 2007.
12. MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y., SORRELLS, M.E., KLEIN, P.E., SCHAFFERT, R.E., Li, L., KOCHIAN, L.V. *Genetics* 167: 1905-1914, 2004.

13. MARTIN, R.B. 1992. Aluminum speciation in biology. In: Aluminum in Biology and Medicine (eds) Chadwick, D.J.; Whelan, J. John Wiley and Sons, New York. pp. 5-25.
14. PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.; KOCHIAN, L.V. Plant Physiol, 112:591-97, 1996.
15. RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Plant Mol Biol, 52:527-60, 2001.
16. RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. J Exp Bot,44:437-46, 1992.
17. SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. Plant Journal, 37:645-653, 2004.
18. WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E. ; RAO, I.M. Plant Physiology, 125:1473-1484, 2001.
19. ZHENG, S. J.; YANG, J. L.; HE, Y. F.; YU, X. H.; ZHANG, L.; YOU, J. F.; SHEN, R. F.; MATSUMOTO, H. Plant Physiol, 138:297-303, 2005.

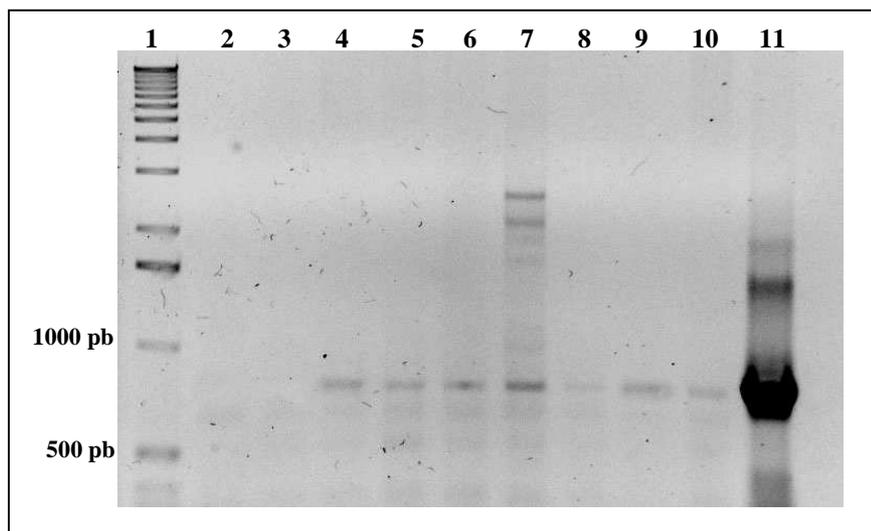


Figura 1: Amplificação por PCR do gene *Alt<sub>SB</sub>* dos eventos de milho contendo a construção Ubiquitina::*Alt<sub>SB</sub>*::NOS. Linhas (1) Marcador Molecular 1Kb Lambda; (2) Branco da reação; (3) Milho não transgênico; (4 a 10) Eventos transgênicos; (11) Plasmídeo usado na transformação.

## Superexpressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*, aluminum tolerance *Sorghum bicolor*, em plantas transgênicas de milho

Monalisa H. Carneiro<sup>1</sup>, Jurandir V. Magalhães<sup>2</sup>, Newton Portilho Carneiro<sup>2</sup>, Claudia T. Guimarães<sup>2</sup>, Andréa A. Carneiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista McKnight Foundation [monalisacarneiro@yahoo.com.br](mailto:monalisacarneiro@yahoo.com.br), <sup>2</sup>Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo, CP 151 CEP 35701-1000, SeteLagoas-MG. [jurandir@cnpmc.embrapa.br](mailto:jurandir@cnpmc.embrapa.br), [newtonc@cnpmc.embrapa.br](mailto:newtonc@cnpmc.embrapa.br), [claudia@cnpmc.embrapa.br](mailto:claudia@cnpmc.embrapa.br), [andreaac@cnpmc.embrapa.br](mailto:andreaac@cnpmc.embrapa.br)

Os rendimentos agrícolas são substancialmente reduzidos pela toxicidade de alumínio (Al<sup>+3</sup>) em solos ácidos, os quais representam 68% ou 250 milhões de hectares do território brasileiro e, aproximadamente 50% das terras agricultáveis do planeta. O gene *ALT<sub>SB</sub>*, que confere tolerância a linhagens de sorgo ao Al, foi isolado e caracterizado por pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, em parceria com equipes internacionais, dedicados ao estudo genético, fisiológico e molecular da tolerância ao Al em gramíneas. O presente trabalho tem como base a utilização deste gene para a geração de cultivares transgênicas de milho com patamares superiores de adaptação aos solos ácidos. O gene *Alt<sub>SB</sub>* controlado pelo promotor da Ubiquitina de milho e pelo terminador NOS de *Agrobacterium* foi introduzido no genoma do híbrido de milho HiII via biobalística. Foram regeneradas 20 plantas de milho em meio contendo glufosinato de amônia, sendo sete eventos diferentes. DNA genômico foi isolado dos sete eventos gerados e, a reação de amplificação por PCR utilizando os primers específicos *ALT<sub>SB</sub>* JL57 (5'GTG CTG GAT CCG ATC CTG AT3') e *ALT<sub>SB</sub>* JL58 (5'CAC TGC CCG AAG AAA CTT CCA3') confirmou a inserção do gene *ALT<sub>SB</sub>* no genoma das plantas de milho. Plantas transgênicas se encontram em casa-de-vegetação em fase de maturação dos grãos, e sua tolerância ao Al<sup>+3</sup> será futuramente testada.

Palavras-chave: *Zea mays*, biobalística, transgênicos, estresse, alumínio.