

# Superexpressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*, aluminum tolerance *Sorghum bicolor*, em plantas transgênicas de milho<sup>1</sup>

Valdênia Lopes da Silva<sup>2</sup> e Andrea Almeida Carneiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig/McKnight Foundation

<sup>2</sup> Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/CNPq/Embrapa/ FAPED

<sup>3</sup> Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo

## Introdução

No Brasil, os solos ácidos são frequentemente encontrados na região que compreende o Cerrado, área que cobre uma extensão de 205 milhões de ha, dos quais mais de 200 milhões são aptos à agricultura (ADÂMOLI et al., 1986). Muitas vezes, os solos do Cerrado possuem concentrações de alumínio que ultrapassam o limite inofensivo para muitas plantas, chegando a atingir concentrações entre 10-20 ppm (RIZZINI, 1997). A toxidez provocada por altas concentrações de alumínio pode ser considerada uma das principais causas da baixa produtividade agrícola dos solos ácidos.

O alumínio trocável, além de ser um elemento prejudicial ao crescimento do sistema radicular, interfere na absorção e na movimentação de fósforo, cálcio e magnésio na planta, contribuindo, também, para a adsorção do fósforo no solo (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

O gene *Alt<sub>SB</sub>*, que confere tolerância ao Al em linhagens de sorgo, foi isolado e caracterizado por pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo em parceria com equipes internacionais dedicadas ao estudo genético, fisiológico e molecular da tolerância ao Al em gramíneas. A presente pesquisa tem como base a utilização desse gene para a geração de cultivares transgênicas de milho com patamares superiores de adaptação aos solos ácidos.

Plantas transgênicas de milho são produzidas utilizando estratégias tais como biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*. Entretanto, utilizando ambas as metodologias são inseridas na planta, além do gene de interesse agrônomo, sequências estruturais presentes nos vetores de transformação. Estas sequências podem ocasionar rearranjos, recombinações ilegítimas e instabilidade de expressão do transgene. Além do mais, a permanência destas sequências estruturais em plantas transgênicas comerciais trazem preocupações relacionadas com a biossegurança do organismo gerado. Esse projeto propõe a comparação da expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* em plantas transgênicas de milho geradas via bombardeamento de partículas utilizando a tecnologia do cassete gênico mínimo, bombardeamento com o cassete total e *Agrobacterium tumefaciens*.

O objetivo específico relacionado com a bolsa do PIBIC, dentro desse projeto, é a produção da construção gênica linear, bem como a análise molecular das plantas transgênicas geradas através das diferentes metodologias de transformação.

## Material e Métodos

Isolamento dos genes *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* e *Ubi::bar::NOS*: O cassete gênico *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS*, presente no vetor binário pCAMBIA3301, foi isolado após uma digestão parcial utilizando as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*. Em seguida, o fragmento de 4,2 kb foi isolado do gel e subclonado no vetor pUC18 digerido com *HindIII* e *EcoRI*.

O cassete gênico *Ubi::bar::NOS*, presente no vetor pAHC20, foi isolado após uma digestão parcial utilizando a enzima de restrição *EcoRI*. Em seguida, o fragmento

de 2,9 kb foi isolado do gel e subclonado no vetor pBS digerido com *EcoRI*. O gene *Alt<sub>SB</sub>* sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina foi clonado no vetor pUC18; o gene de seleção *bar* sob o controle do promotor da Ubiquitina foi clonado no vetor pBS.

Tanto o cassete gênico *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* no vetor pUC18 e o *Ubi::bar::NOS* no vetor pBS foram transformados em *E. coli* usando o protocolo de choque térmico. Colônias bacterianas que cresceram na presença de ampicilina foram, em seguida, crescidas separadamente em meio LB líquido e o plasmídeo foi isolado, segundo Sambrook et al. (1989), para confirmação das construções. Colônias contendo as construções corretas foram estocadas em solução estéril de glicerol 30% em freezer a -80°C.

#### Análises de plantas transgênicas

PCR : A extração de DNA genômico das plantas produzidas foi realizada segundo Sambrook et al. (1989). Foram feitas reações de PCR para detecção dos genes *Alt<sub>SB</sub>* e *bar* nas amostras de DNA. Para uma reação de 25 µL foram utilizados 2 µL de tampão 10x (Invitrogen), 2 µL de dNTPs (10mM), 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM - Invitrogen), 0,1 µL de Taq DNA Polimerase 5 U/ µL (Invitrogen), 17,1 µL de H<sub>2</sub>O, 1 µL de DNA template (10ng µL/µL) e 1 µL de cada um dos *Primers* (10 µM) [*Alt<sub>SB</sub>*: JL 57 F (GTG CTG GAT CCG ATC CTG AT) x JL 58 R (CAC TGC CGA AGA AAC TTC CA) e *bar*: BarF (5'AGA AAC CAC GTC ATG CC3') e BarR (5'TGC ACC ATC GTC AAC CAC3')]. Para o gene *Alt<sub>SB</sub>* o termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi programado para uma desnaturação inicial de 1 segundo a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 40 segundos e extensão 72°C por 1 minuto e meio, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o gene *bar* o aparelho foi programado para uma desnaturação inicial de 5 segundos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento 60°C por 15 segundos e extensão 72°C por 15 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 15 segundos. Os produtos dessas reações foram separados por eletroforese a 100 Volts por 40 minutos, em gel de agarose 1% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0). Os géis tratados com brometo de etídio (1µg/mL) foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Gel Logic 2000 Imaging System (Carestream Health, New Haven, CT) e as imagens capturadas e estocadas no programa Kodak Molecular Imaging Software Ready – Standard Edition v.4.5.0.

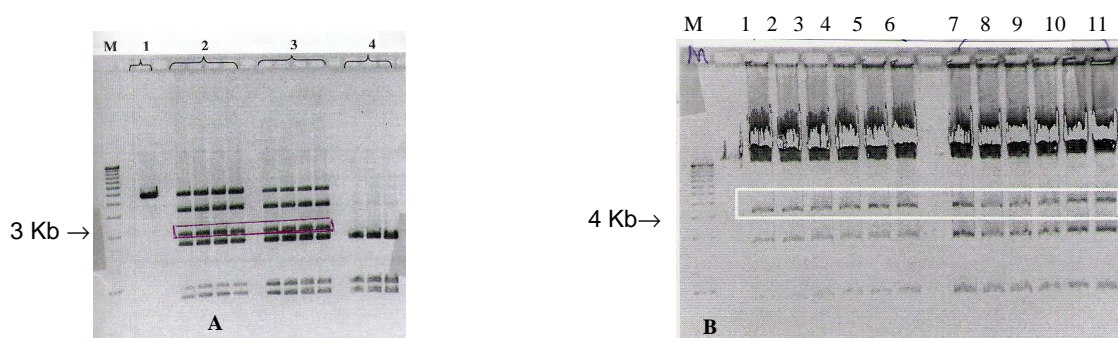
Southern Blot: Para a confirmação da presença do gene *Alt<sub>SB</sub>* nas plantas geradas, DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI*. DNA digerido foi separado em gel de agarose 0,8% utilizando tampão TAE 1X (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, o gel foi tratado com brometo de etídio (1µg/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas e estocadas no programa Kodak Molecular Imaging Software Ready – Standard Edition v.4.5.0. Inicialmente o gel foi lavado em solução de depuração (355,6 mM HCl) por 10 minutos, denaturado (solução de NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 30 minutos e em seguida neutralizado (solução de NaCl 1,5 M e Trizma base 0,5 M e pH 7,5) por 30 minutos. Todas as etapas acima citadas foram feitas sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup> (Ge Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK) de acordo com a instrução do fabricante. Transgenes foram detectados usando a sonda *Alt<sub>SB</sub>*. A marcação da sonda e a detecção da membrana foram feitos utilizando o kit Amersham™ AlkPhos Direct Labelling Reagents (Ge Healthcare UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK) de acordo com instruções do fabricante. A sonda foi preparada por digestão parcial do plasmídeo pCAMBIA 3301 contendo a construção *Ubi:: Alt<sub>SB</sub>::NOS*, utilizando a enzima *BamHI*, correspondendo à 1,8 Kb, e purificado com GENECLEAN® II Kit (Q-Biogene, Rutherford Road, Carlsbad, Califórnia), conforme descrito pelo fabricante.

## Resultados e Discussão

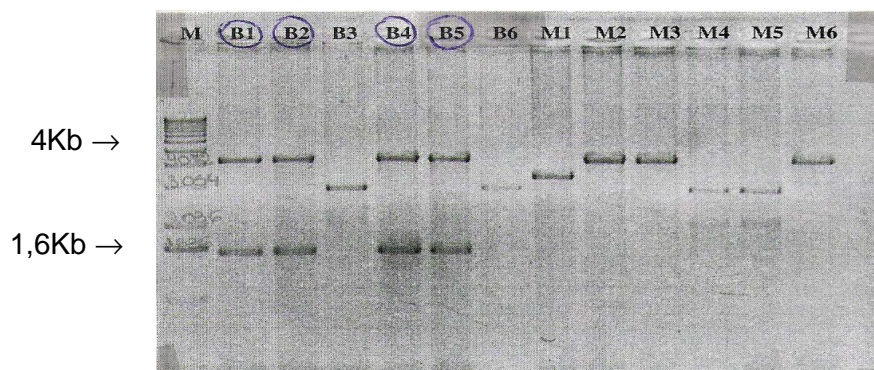
### Clonagem dos genes *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* e *Ubi::bar::NOS* nos plasmídeos pUC18 e pBS:

Para o isolamento do fragmento *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* do vetor binário pCAMBIA3301, foi feita uma digestão parcial deste plasmídeo com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*. A digestão parcial foi necessária por que existe um sítio de *EcoRI* dentro do fragmento *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS*. Alíquotas da reação enzimática foram tiradas após 3 e 5 minutos de reação. A banda correspondente ao fragmento inteiro *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* com um tamanho de 4,2 Kb foi isolada do gel usando o kit Gene Clean de isolamento de DNA (Figura 01-A). Para o isolamento do fragmento *Ubi::bar::NOS* do vetor pAHC20, foi feito o mesmo procedimento descrito acima, gerando uma banda de 1,9 kb (Figura 01-B).

Após a subclonagem dos fragmentos *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* e *Ubi::bar::NOS* nos plasmídeos pUC18 e pBS, respectivamente, estas reações foram transformadas em *E. coli* via choque térmico e as bactérias transformadas foram selecionadas em LB contendo 50 mg/L de ampicilina. O DNA plasmidial foi isolado de 10 colônias bacterianas e o perfil de digestão destes plasmídeos foi utilizado para selecionar as colônias contendo os insertos corretos (Figura 02).



**Figura 01.** (A) Digestão parcial do plasmídeo pAHC20 com *EcoRI*. Retângulo vermelho representa a banda de 2,9 Kb correspondente à construção gênica *Ubi::bar::NOS* ; (B) Digestão parcial do plasmídeo pCAMBIA 3301 com *HindIII* e *EcoRI*. Retângulo branco representa a banda de 4.2 Kb correspondente à construção gênica *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS*. M – Marcador Molecular 1 Kb (Invitrogen).



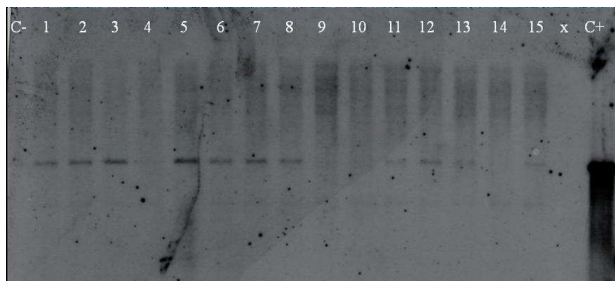
**Figura 02.** DNA plasmidial isolado de bactérias transformadas com as ligações dos fragmentos lineares *Ubi::bar::NOS* (canaletas B1 a B6) e *Ubi:: Alt<sub>SB</sub>::NOS* (canaletas M1 a M6), nos vetores pBS e pUC18, respectivamente.

A Figura 02 mostra que as construções presentes nas canaletas B1, B2, B4 e B5 (*Ubi::bar::NOS*) apresentaram os tamanhos corretos esperados. Para a construção gênica *Ubi::Alt<sub>SB</sub>::NOS* não foram encontrados clones com os tamanhos corretos esperados. Experimentos estão em andamento para a clonagem correta deste fragmento.

#### Análises de plantas transgênicas

Análises de PCR confirmaram a presença do gene *Alt<sub>SB</sub>* em 39 dos 46 eventos gerados via biobalística, o que corresponde a 84,78% de cotransformação dos genes *bar* e *Alt<sub>SB</sub>*. Durante o processo de cultura de tecidos associado com a transformação, eventos transformados foram selecionados em meio contendo fosfotricina. Assim é esperado que apenas os eventos que continham o gene *bar* corretamente inserido no genoma e expressando fossem selecionados. Algumas vezes, o gene de interesse pode não ser integrado no genoma devido à fragmentação da construção gênica durante os processos de precipitação do DNA nas micropartículas e transformação via biobalística. Das 8 plantas T0 geradas via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, foram feitas análise molecular em apenas 5. PCR desses eventos mostraram um resultado semelhante aos resultados obtidos com a biobalística. Nos eventos cotransformados dos genes *bar* e *Alt<sub>SB</sub>* não foi identificado em um o gene *Alt<sub>SB</sub>*. No caso da transformação mediada por *A. tumefaciens* a cotransformação do gene de seleção e do gene de interesse, *Alt<sub>SB</sub>*, foi de 80%.

Análises de Southern blot foram realizadas a partir do DNA total extraído para confirmar a presença do gene *Alt<sub>SB</sub>*. DNA de sete eventos derivados do bombardeamento de partículas e 8 eventos de *Agrobacterium tumefaciens* foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, a qual gera um fragmento de 2,620 Kb (Figura 03) que confirma a presença do gene. Eventos transgênicos apresentaram a banda esperada, enquanto que no controle não transgênico não houve nenhuma hibridização.



**Figura 03.** Southern blot de plantas T1 transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística. Canaletas: (C-) plantas não transformadas; (1 a 16) eventos transgênicos; (C+) Plasmídeo *Ubi:: Alt<sub>SB</sub>::NOS*, digeridas com *ECO RI*.

#### Referências

ADÂMOLI, J.; MACEDO, J.; AZEVEDO, L.G. de; MADEIRA NETTO, J. Caracterização da região dos cerrados. In: GOEDERT, W. J. **Solos dos Cerrados**: tecnologia e estratégias de manejo. [Planaltina, DF]: Embrapa-CPAC; São Paulo: Nobel, 1986. p. 33-74.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 531-541, 2001.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.