

**Análise do Promotor do Gene Transportador de Fosfato de *Arabidopsis thaliana*,
AtPT2, em Plantas de Milho Transgênicas**

[Previous](#) [Top](#)
[Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato G

¹GRACIELLE T. COSTA, ²ROSÂNGELA L. BRANDÃO, ²MARIANA C. A. GONÇALVES, ²RUTH H. UTIDA, ²ROBERT E. SCHAFFER, ²VERA M. C. ALVES, ²NEWTON P. CARNEIRO e ²ANDRÉA A. CARNEIRO

(1)Depto Ciências Biológicas, PUC-MG; (2) Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151; andrea@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: promotor, transgênicos, estresse abiótico, milho, gene repórter

INTRODUÇÃO

No Brasil, solos ácidos são frequentes na região que compreende o Cerrado, área que cobre uma extensão de 204 milhões de ha, dos quais 127 milhões são aptos à agricultura. O Cerrado responde por 25% da safra brasileira de milho, soja e arroz, entre outros grãos cultivados em uma área de 10 milhões de ha. A baixa fertilidade dos solos é um dos maiores problemas para o desenvolvimento agrícola e produção de alimentos, nos solos ácidos do Cerrado. A toxidez de alumínio e a deficiência de fósforo são os grandes fatores que limitam a produtividade agrícola nestas áreas.

O fósforo inorgânico (Pi) é um dos nutrientes menos disponíveis nos solos ácidos, encontrado frequentemente em concentrações similares à dos micronutrientes. Muitos dos constituintes dos solos ácidos, principalmente os óxidos de ferro e alumínio, têm grande afinidade pelo Pi. Na sua forma complexada, Pi não é liberado no solo e se encontra indisponível para a planta. Além de complexar com o Pi, o alumínio presente nestes tipos de solo é tóxico para as extremidades das raízes, inibindo o crescimento radicular (Kochian, 1995; Delhaize and Ryan, 1995).

A produção de variedades de plantas mais adaptadas a estes tipos de solos, obtidas por melhoramento clássico ou engenharia genética, parece ser a melhor solução para resolver os problemas de fertilidade do Cerrado. Em diferentes espécies de plantas (trigo, milho, centeio, feijão, etc) tem sido mostrado que a tolerância ao alumínio ocorre por exclusão mediada pela liberação de ácidos orgânicos, tais como citrato, malato ou oxaloacetato, na presença de alumínio. No processo de exclusão, o ácido orgânico quela o Al⁺³ presente na rizosfera e previne sua entrada no ápice da raiz (Bhatti, et al. 1998). Ácidos orgânicos também participam de reações químicas de trocas, onde o Al e/ou Fe complexados com Pi do solo são deslocados e passam a formar complexos estáveis com os ácidos orgânicos, ficando o Pi disponível para as plantas (Fox, et al. 1990).

O enorme progresso alcançado pela biologia molecular e celular nos últimos anos permitiu o isolamento e caracterização de genes que codificam para ácidos orgânicos, transportadores de fosfato, fosfatases e promotores específicos para diferentes tecidos que podem ser utilizados para gerar cultivares transgênicos mais tolerantes ao alumínio presente no solo do cerrado, bem como mais eficientes na absorção do fósforo (Fuente et al., 1997; Muchhal et al., 1996). Muchhal et al., 1996 mostraram que o promotor do gene transportador de fosfato AtPT2, isolado de *A. thaliana*, é capaz de direcionar a expressão de genes repórteres em raízes de tabaco sob deficiência de Pi. Este promotor poderia ser utilizado para direcionar a expressão de genes como o da citrato sintase e transportadores de Pi nas raízes de diferentes plantas, e assim reduzir o custo em carbono de plantas crescendo sob estresse. Neste estudo, foi analisada a capacidade do promotor AtPT2, isolado de *A. thaliana*, de direcionar a expressão do gene repórter GUS, em plantas transgênicas de milho, sob o estresse de Pi.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma seqüência de 2300 bp da região 5' não-codante do promotor do gene AtPT2 foi isolada através de amplificação por PCR e, subclonada na frente da região codante do gene repórter GUS (β -glucuronidase) (Figura 01).

Na produção de milho transgênico via biobalística, embriões imaturos, 1,0 - 1,5 mm, foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 28 dias em meio CI (Chu et al., 1975) e bombardeados de acordo com Carneiro et al., 2000. A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio SM (meio CI sem prolina) suplementado com glufosinato de amônia. Calos foram subcultivados a cada 2 semanas em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 e 9 mg/l). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura, capazes de crescer em presença do agente seletivo, foram transferidas para solo em casa de vegetação.

DNA genômico foi isolado de 38 plantas transformadas usando o protocolo de Dellaporta et al. (1983). A presença da construção gênica AtPT2.GUS nas plantas regeneradas foi confirmada utilizando os primers A6 e A7 (CCA GTG TCT CCG TTC ACC TT e AAC GGA TCC TCT TCT CCT CTG CAA), os quais amplificam uma região de 588 pb do promotor. Cada 25 μ l de reação continha tampão de PCR 1X, 2 mM de MgCl₂, 100 μ M de cada dNTP, 0,2 μ M de cada um dos primers A6 e A7, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguido de 30 ciclos de amplificação (15"- 94°C, 15"- 55°C, 30"- 72°C), e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para avaliar a expressão da enzima β -glucuronidase (gene repórter GUS), controlada pelo promotor AtPT2, foram realizados testes histoquímicos, de acordo com a metodologia descrita por Rech e Aragão (1996). Para esses testes, 4 repetições de sementes provenientes de 10 eventos transgênicos distintos foram utilizadas. As sementes foram desinfestadas superficialmente em 50% água sanitária comercial durante 10 minutos sob agitação. Após esta etapa elas foram enxaguadas em água destilada 3 vezes e colocadas para germinar em papel Germitest, por 4 dias em água. Em seguida, as plântulas foram transferidas para solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982) por mais 4 dias e, depois deste período, 4 plantas de cada evento e o controle não transgenico foram transferidas para solução nutritiva sem fósforo. As 4 plantas restantes foram mantidas em solução nutritiva completa. Após 5 dias nos diferentes tratamentos as plantas foram colhidas para análise da expressão de GUS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas através bombardeamento de partículas, cultura de tecido e seleção, 38 plantas de milho transgênicas, sendo 10 eventos diferentes, com a construção AtPT2-GUS. Estes eventos foram crescidos em casa de vegetação e submetidos a testes moleculares para confirmação da transgenia (Figura 02).

O gene AtPT2 codifica para uma proteína de membrana transportadora de fosfato em *Arabidopsis thaliana* (Muchhal et al., 1996). Com o objetivo de estudar o funcionamento do promotor AtPT2, isolado de *Arabidopsis thaliana*, no sistema heterólogo do milho, 2300 bp da região 5' não-codante do gene AtPT2 foi subclonada na frente da região codante do gene repórter GUS (β -glucuronidase). De acordo com os dados apresentados por Karthiketyan et al.(2002), a expressão do repórter gene GUS foi detectada apenas nos tratamentos onde as plantas de milho foram submetidas ao estresse de fósforo, sugerindo que plantas compartilham mecanismos regulatórios comuns para a ativação de genes envolvidos na resposta a este tipo de estresse. Entretanto, em oposição aos resultados obtidos com plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco transformadas com esta mesma construção (Karthiketyan et al., 2002), a expressão do gene repórter GUS, neste experimento, não foi restrita às raízes. Na Figura 4, observa-se a presença da β -glucuronidase em raízes e no sistema vascular de folhas de milho.

Os resultados sugerem que os mecanismos de regulação do gene AtPT2 isolado de *A. thaliana*, possuem semelhanças com os mecanismos de regulação de genes envolvidos com o estresse de fósforo em milho. Entretanto, as regiões relacionados com o direcionamento da expressão preferencialmente, do gene AtPT2, em raízes de dicotiledôneas parecem não serem conservados para o milho, uma monocotiledonea.

LITERATURA CITADA

- BHATTI JS, COMERFORD NB, JOHNSTON CT. Influence of oxalate and soil organic matter on sorption and desorption of phosphate onto a spodic horizon. Soil Sci.Soc.Am.J. 62:1089-1095. Soil Sci.Soc.Am.J. 62:152-158.1998.
- CARNEIRO A. A., CARNEIRO N.P., CARVALHO C.H.S., VASCONCELOS M.J.V., LOPES M.A., PAIVA E. Milho Transgênico : Melhoria da Qualidade Nutricional do Grão. Bio Tecnologia. 15: 42-46. 2000.
- CHU C.C., WANG C.C., SUN C.S., HSU C., YIN K.C., CHU C.Y., BI F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparaative experiments on the nitrogen sources. Sci Sinica 18; 659 – 668.1975.

DELLAPORTA S.L., WOOD J., HICKS J.B. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19 – 21. 1983.

DELHAIZE E, RYAN P. Update on environmental Stress: Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107(2):315-321. 1995.

FOX TR, COMERFORD NB, MCFEE WW. Phosphorus and aluminum release from a spodic horizon mediated by organic-acids. *Soil Sci.Soc.Am.J.* 54:1763-1767. *Soil Sci.Soc.Am.J.* 54:1763-1767. 1990.

Fuente, J.M.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA ESTRELA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, v.276, p.1566-1568. (1997).

KARTHIKEYAN, A.S.; VARADARAJAN, D.K.; D'URZO, M.P.; DAMSZ, B. RAGHOTHAMA, K.G.(2002). Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. *Plant Physiology.* v130, p.221-233.

KOCHIAN L. V. Cellular mechanisms of aluminum resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*46: 237-260. 1995.

MAGNAVACA R. (1982). Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Nebraska: University of Nebraska. 135 p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético de Plantas) - University of Nebraska.

MUCHHAL, US, PARDO JM, RAGHOTHAMA KG Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 10519-10523. 1996.

RECH, E.L.; BEM, R. de; ARAGÃO, F.J.L. Biolistic mediated gene expression in cattle tissues in vivo. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, v.29, p. 1265-1267, 1996

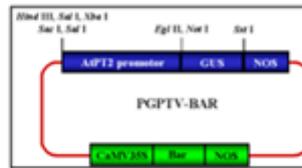


Figura 1: Construção Genética AtPT2.GUS. AtPT2: promotor isolado de *A. thaliana* sob estresse de Pi; GUS: gene repórter β -glucuronidase; NOS: terminador; pGPTV: vetor; CaMV35S: promotor constitutivo viral; bar: gene que confere resistência ao herbicida Finale; HindIII, SalI, XbaI, SacI, SalI, EglII, NotI, SmaI: sítios de enzima de restrição.

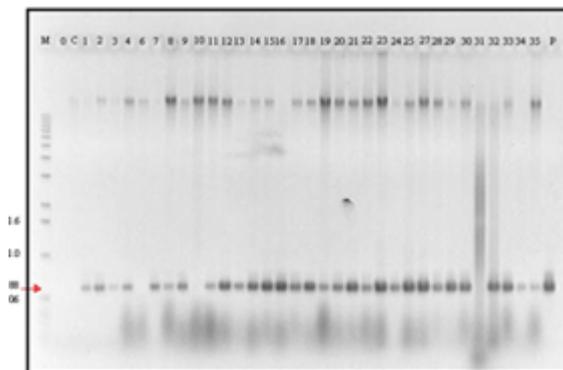


Figura 2: Plantas Transgênicas de Milho Contendo a Construção AtPT2.GUS. PCR: Primers A6 X A7. M: 1 Kb Marcador Molecular; O: PCR branco; C: Controle Negativo; P: Plasmídeo; 1 a 35 DNA de plantas transgênicas.

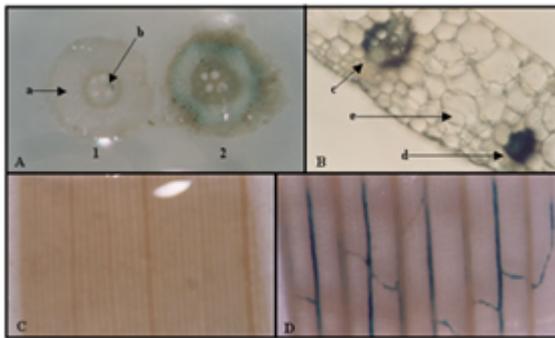


Figura 3: Expressão do Gene Repórter GUS em Plantas Transgênicas de Milho Contendo a Construção AtPT2.GUS. (A) Raiz de Milho: 1) Após 5 dias em solução nutritiva completa; 2) Após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo; (B) Corte transversal de uma folha de milho após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo; (C) Folha de milho após 5 dias em solução nutritiva completa; (D) Folha de milho após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo. (a) cortex; (b) cilindro vascular; (c,d) feixe vascular; (e) merístico foliar.

