

**SUPEREXPRESSÃO DO *ADP/ATP*
TRANSLOCASE EM MILHO SUBMETIDO AOS
ESTRESSES SALINO E DE ALUMÍNIO**

CAROLINE PEREIRA PETRILLO

2007

CAROLINE PEREIRA PETRILLO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. José Donizeti Alves

Lavras
Minas Gerais – Brasil
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Petrillo, Caroline Pereira.

Superexpressão do ADP/ATP translocase em milho submetido aos estresses salino e de alumínio / Caroline Pereira Petrillo. - Lavras: UFLA, 2007.

122 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Milho. 2. ADP/ATP translocase. 3. Transgênico. 4. Estresse abiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-584.920488

CAROLINE PEREIRA PETRILLO

**SUPEREXPRESSÃO DO *ADP/ATP TRANSLOCASE* EM MILHO
SUBMETIDO AOS ESTRESSES SALINO E DE ALUMÍNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 13 de julho de 2007.

PhD. Andréa Almeida Carneiro EMBRAPA Milho e Sorgo

PhD. Newton Portilho Carneiro EMBRAPA Milho e Sorgo

PhD. Antônio Álvaro Corsetti Purcino EMBRAPA Milho e Sorgo


Prof. José Luiz Alves
UFLA
(Orientador)

Lavras
Minas Gerais – Brasil

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mozart e Lucimar, e às minhas irmãs, Cynthia, Christiane e Camila, pelo amor e apoio transmitidos em todas as etapas da minha vida. Ao meu marido, Richard, pelo amor, carinho e paciência nesses 11 anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tenho. Aos meus pais, Mozart e Lucimar; às minhas irmãs, Cynthia, Christiane e Camila e ao meu marido, Richard, pelo incentivo e confiança. A todos meus familiares, sogro, sogra, cunhados, concunhadas e amigos. A Dra. Andréa (co-orientadora) e ao Dr. Newton, pelos ensinamentos científicos. Ao Dr. Antônio Álvaro e ao Dr. Donizeti (orientador), pela oportunidade e confiança depositada em mim. Aos amigos do LBC e LBM, Mariana, Raymundo, Marília, Ruth, Maíra, Ana Flávia, Leandro, Rosângela Santos, Edmilson e Fernanda, pelo auxílio e apoio. Aos técnicos da Embrapa Célio, Edna, Gislene, Miguel e Bira, pela ajuda nos experimentos. Às amigas Rosângela Luci e Gracielle, pela amizade, ajuda e incentivo. A amiga Cíntia que, mesmo de longe (Alemanha), sempre esteve presente. Ao Dr. Marcelo Murad (UFLA), pelas dicas. À UFLA, pela oportunidade e a todos do setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade. À CAPES e a Embrapa Milho e Sorgo, pelo apoio técnico-científico e financeiro.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES INDUZIDOS POR ALUMÍNIO EM ÁPICES DE RAÍZES DE ARROZ, MILHO E SORGO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 ALUMÍNIO	3
2.2 BIBLIOTECA DE CDNA.....	3
2.3 HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA SEGUIDA DE PCR SUPRESSIVO (SSH).....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1 GERMINAÇÃO DE SEMENTES E ESTRESSE DE AL	6
3.2 EXTRAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO (RNAM)	7
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DIFERENCIALMENTE INDUZIDOS PELO ALUMÍNIO.....	7
3.4 SÍNTESE DA PRIMEIRA FITA DE CDNA	10
3.5 HIBRIDAÇÕES.....	12
3.6 PCR SUPRESSIVO (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE).....	13
3.7 SEQÜENCIAMENTO DOS GENES OBTIDOS	14
3.8 CONSTRUÇÃO DE PRIMERS ESPECÍFICOS.....	14
3.9 RT – PCR.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.2 ADP/ATP TRANSLOCASE MITOCONDRIAL	32
4.3 ATP SINTASE MITOCONDRIAL E ATPASE VACUOLAR	33
4.4 GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE	33
4.5 SEC 14	33
4.6 CALRETICULINA	34
4.7 BETA KETOACIL REDUTASE (GL8).....	34
4.8 ASPARTATO AMINOTRANSFERASE	35
4.9 TRANSPORTADOR DE FOSFATO MITOCONDRIAL.....	35
4.10 RT – PCR (TRANSCRIPTASE REVERSA).....	35
5 CONCLUSÕES.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO 2: GENETIC TRANSFORMATION OF TROPICAL MAIZE GENOTYPES VIA BIOLISTICS

ABSTRACT	iii
RESUMO.....	iv
1 INTRODUCTION.....	48
2.1 EXPLANT PREPARATION	50
2.2 SELECTION AND PLANT GROWTH	50
2.3 PLASMID CONSTRUCT.....	51
2.4 DNA BOMBARDMENT	51
2.5 HISTOCHEMICAL GUS ACTIVITY ASSAY.....	52
2.6 ANALYSIS OF TRANSGENIC R0 PLANTS.....	52
3 RESULTS AND DISCUSSION	53
3.1 MAIZE TISSUE CULTURE.....	53
3.2 DNA DELIVERY PARAMETERS AND TRANSGENIC MAIZE PRODUCTION.....	54
3.4 TRANSGENE INTEGRATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF R0 TRANSGENIC PLANTS.....	59
4 REFERENCES.....	61

CAPÍTULO 3: SUPEREXPRESSÃO DO ADP/ATP TRANSLOCASE EM MILHO SUBMETIDO AOS ESTRESSES SALINO E DE ALUMÍNIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO	64
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	66
2.1 CULTURA DO MILHO.....	66
2.2 CARACTERÍSTICAS DO CERRADO BRASILEIRO	66
2.3 ALUMÍNIO	66
2.4 SALINIDADE	68
2.5 GENE ADP/ATP TRANSLOCASE	71
2.6 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO VIA BIOBALÍSTICA	72
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
3.1 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE MILHO VIA BIOBALÍSTICA	74
3.1.1 Preparação do explante na cultura de tecidos	74
3.1.2 Construção gênica.....	74
3.1.3 Biobalística.....	76
3.1.4 Seleção de calos bombardeados e regeneração de plantas.....	80

3.2 ANÁLISES MOLECULARES	81
3.2.1 Extração de DNA genômico	81
3.2.2 PCR – reação em cadeia da polimerase	82
3.2.3 Extração de RNA total com trizol	83
3.2.4 RT – PCR (transcriptase reversa)	83
3.3 TESTES FISIOLÓGICOS	84
3.3.1 Estresse de alumínio em câmara de crescimento.....	84
3.3.2 Estresse salino	85
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1 SELEÇÃO DOS CALOS BOMBARDEADOS, REGENERAÇÃO DE PLANTAS E APLICAÇÃO DE PPT	86
4.2 PCR	87
4.3 RT – PCR	89
4.4 TESTES FISIOLÓGICOS	90
4.4.1 Estresse de alumínio	90
4.4.2 Estresse salino	95
5 CONCLUSÕES.....	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

**CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
INDUZIDOS POR ALUMÍNIO EM ÁPICES DE RAÍZES DE ARROZ,
MILHO E SORGO**

RESUMO

Petrillo, Caroline Pereira. Prospecção e Caracterização de Genes Especificamente Induzidos por Alumínio em Ápices de Raízes de Arroz, Milho e Sorgo. In: _____. **Superexpressão do *ADP/ATP Translocase* em Milho Submetido aos Estresses Salino e de Alumínio**. 2007. Cap. 1, p. 1-47. Dissertação (Mestre em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Cerca de 24% do território brasileiro é ocupado pelo cerrado. Nessa região, a toxidez do alumínio é o principal problema para o desenvolvimento de plantas economicamente importantes. A cultura do milho é uma das mais importantes para essa região e algumas cultivares comerciais apresentam sensibilidade ao alumínio. A geração de tecnologias que permitam o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes ao complexo de estresses existentes nas áreas de solos ácidos tem alta relevância para o agronegócio brasileiro. O estudo de genes é uma importante ferramenta para o entendimento dos mecanismos moleculares. Neste estudo, genes induzidos pelo Al foram prospectados no ápice das raízes de plantas monocotiledôneas de arroz, milho e sorgo colocadas em solução nutritiva contendo níveis críticos de alumínio para cada cultivar, durante 1 e 4 horas de exposição. Para o isolamento desses genes, foi utilizada a técnica de hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo (SSH). Esses genes foram seqüenciados e comparados com seqüências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). A revisão de literatura indicou que vários desses genes estão relacionados a mecanismos de proteção ao estresse de Al, estresse oxidativo, estresse de frio, estresse salino, manutenção da integridade da parede celular, tráfico de solutos e energia entre células. Esses genes serão usados, posteriormente, para a montagem de cassetes gênicos e transformação genética de plantas.

Palavras-chave: alumínio, milho, hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo, genes induzidos por Al.

Comitê Orientador: Dr. José Donizeti Alves, UFLA/ DBI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

Petrillo, Caroline Pereira. Prospection and Characterization of Genes Specifically Induced by Aluminum in Apex of Rice, Maize and Sorghum Roots. In: _____. **Superexpressão do *ADP/ATP Translocase* em Milho Submetido aos Estresses Salino e de Alumínio.** 2007. C. 1, p. 1-47. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The Cerrado occupies about 24% of the Brazilian territory. The toxicity of aluminum is the main problem for the development of economically important plants in this region. The maize culture is one of most important in this region. Some commercial cultivars show sensitivity to aluminum. The generation of technologies that allow the development of more tolerant genotypes to the existing stress complexes in acid soil areas have high importance for the Brazilian agricultural business. The study of genes is an important tool for the understanding of molecular mechanisms. In this study, Al induced genes were prospected in the apex of the monocot plants of rice, maize and sorghum roots, placed in nutritive solution containing critical aluminum levels for each cultivar, during 1 and 4 hours of exposition. For the isolation of these genes, the Suppression Subtractive Hybridization technique (SSH) was used. These genes were sequenced compared with sequences deposited in the GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). The literature revision showed that several of these genes are related with mechanisms of protection to Al stress, oxidative stress, cold stress, salinity stress, maintenance of the integrity of the cellular wall, traffic of solute and energy among cells. These genes will be used, later, for the assembly of genes cassettes and genetic transformation of plants.

Key-words: aluminum, maize, suppression subtractive hybridization, genes induced by Al.

Guidance Committee: Dr. José Donizeti Alves, UFLA/ DBI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado ocupa uma área superior a dois milhões de km², cerca de 24% do território brasileiro, abrangendo os estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Piauí, o Distrito Federal, Tocantins e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, São Paulo, Paraná e Rondônia. Em condições naturais, os solos do cerrado apresentam alta acidez e baixo conteúdo dos nutrientes necessários para a nutrição das plantas (Embrapa Cerrados, 2005). Em pH baixo, o alumínio livre (Al^{+3}) é a espécie predominante, sendo considerada tóxica para as plantas. A toxidez do alumínio é o principal problema para o desenvolvimento de plantas economicamente importantes em solos ácidos do cerrado brasileiro.

A cultura do milho é uma das mais importantes do agronegócio da região dos cerrados, mas, a maioria das cultivares comercial tem baixa tolerância ao alumínio (Cançado et al., 2002).

A geração de novas tecnologias que permitam o desenvolvimento de genótipos de milho mais tolerantes ao estresse de alumínio pode causar um grande impacto econômico no desenvolvimento do agronegócio da região dos cerrados brasileiros. Genes relacionados a mecanismos de tolerância ao Al estão sendo identificados e utilizados para o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (Mariano et al., 2005).

Trabalhos que são realizados com o objetivo de identificar genes induzidos por Al têm permitido a identificação de seqüências putativas envolvidas em vários mecanismos de defesa da planta contra esse tipo de estresse. Esaki et al. (2000) examinaram o papel biológico de genes de tabaco, fungo e arabidopsis, induzidos pelo Al, em plantas de arabidopsis transgênicas. Nesse estudo, foram produzidas quatro linhagens transgênicas mais tolerantes, por transformação via agrobactéria e seis autores concluíram que esses genes

estavam relacionados com mecanismos de proteção dessas plantas contra a toxidez do alumínio.

A identificação de genes relacionados a diferentes estresses é importante para a caracterização das respostas das plantas (Balaji et al., 2006). Uma das estratégias utilizadas para caracterizar genes específicos é a análise de uma biblioteca de cDNA, a qual pode ser obtida pela utilização da técnica da hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo (*supression subtractive hybridization* - SSH). Trata-se de uma técnica bastante eficaz, utilizada para amplificar fragmentos de cDNA diferencialmente expressos e, simultaneamente, suprimir a amplificação do DNA não-diferencial. A SSH foi desenvolvida por Diatchenko et al. (1996) e patenteada pela Clontech (PCR-Select), sendo considerada uma poderosa ferramenta para a identificação de genes expressos diferencialmente.

No presente estudo, genes induzidos pelo alumínio foram prospectados no ápice de raízes de cultivares de milho, sorgo e arroz tolerantes ao Al, a partir de plantas cultivadas em solução nutritiva contendo o nível crítico de Al para cada cultivar. Para tal prospecção, utilizou-se a técnica de hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo. As seqüências dos cDNAs obtidas por meio dessa técnica foram comparadas com as depositadas no GenBank.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alumínio

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, sendo primariamente encontrado sob a forma de aluminossilicatos insolúveis ou óxidos. Em solos ácidos, com valores de pH abaixo de cinco, o alumínio é solubilizado, tornando-se tóxico para as plantas (Vitorello et al., 2005).

A inibição do crescimento da raiz é um dos principais sintomas da toxidez do alumínio em plantas (Kochian, 1995). Por acumular mais Al que em outros tecidos, o ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica do alumínio (Delhaize & Ryan, 1995).

Dentre os vários mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas, destacam-se os mecanismos de exclusão ou apoplástico, que envolve a neutralização do Al externamente e os mecanismos simplásticos, nos quais o Al é detoxificado dentro da célula (Barceló & Poschenrieder, 2002; Kochian et al., 2004).

Algumas espécies de plantas são capazes de exsudar ácidos orgânicos das raízes, tais como o citrato e o malato, sendo esses capazes de quelar o Al e prevenir sua entrada na planta (López-Bucio et al., 2000).

Diversos genes são induzidos pelo estresse de alumínio. Em arábido, a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (Richards et al., 1998) e de genes relacionados a sinais de transdução (Sivaguru et al., 2003) foi induzida pelo Al. Em trigo, o Al induziu genes relacionados à manutenção do citoesqueleto (Cruz-Ortega et al., 1997) e genes transportadores de ácidos orgânicos, tais como o ALMT1 – transportador de malato (Sasaki et al., 2004).

2.2 Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA (DNA complementar) representa a população de RNAm (mensageiro) de uma célula, ou seja, seqüências expressas num

determinado tecido sob influência das condições ambientais. A primeira etapa de formação dessa biblioteca consiste no isolamento do RNAm. Por meio de uma reação catalisada pela enzima transcriptase reversa (RT) é possível formar uma fita de DNA a partir do RNAm. Nessa fase, há a formação de uma molécula híbrida, sendo uma cadeia de RNA e outra de DNA. A cadeia de RNA é, então, substituída por DNA por meio de uma reação catalisada pela enzima DNA polimerase I. Os cDNAs formados são armazenados em vetores de clonagem (plasmídeos).

Os genes diferencialmente expressos podem ser identificados por uma biblioteca subtrativa de cDNA, por meio de RNAs mensageiros específicos presentes em amostras de tecidos ou órgãos em diferentes condições de crescimento.

Diversos métodos são utilizados para analisar a expressão gênica diferencial, tais como a hibridação diferencial com a subtração de cDNA, SAGE (*Serial analysis of gene expression*), DDRT-PCR (*Differential display reverse transcriptional-polymerase chain reaction*) e chips de DNA (Vedoy et al., 1999). De acordo com Xiao et al. (2005), um elevado nível de enriquecimento, baixo “background” e abundância normalizada de cDNAs na biblioteca subtrativa tornam a SSH uma técnica atrativa.

Por meio da bioinformática, as seqüências de cDNAs de uma biblioteca podem ser exploradas e comparadas com outras seqüências depositadas em bancos genômicos, tais como ‘Ensembl Genome Browser’ (www.ensembl.org), ‘Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes’ (www.genome.ad.jp/kegg), GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e GeneQuiz (www.sanger.ebi.ac.uk/gqsrvc/submit), que são de domínio público, podendo obter informações organizadas e a análise comparativa entre dados de diferentes genomas (Binneck, 2004).

2.3 Hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo (SSH)

A hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo (SSH) foi desenvolvida para a geração de bibliotecas subtrativas de cDNA (Diatchenko et al., 1996) e baseia-se na amplificação preferencial de seqüências diferencialmente expressas em duas populações de cDNA por meio da PCR (reação em cadeia da polimerase). Nessa técnica, duas populações de RNAm são convertidas em cDNA, de modo que a população contendo os genes de interesse é denominada como “tester” ou teste e a população controle é denominada “driver” ou controle. Essas amostras de cDNA teste e controle serão digeridas com a enzima de restrição *Rsa* I para a formação de extremidades abruptas, permitindo a ligação de adaptadores. Esses adaptadores são moléculas de DNA que serão utilizados nas etapas finais de amplificação por PCR. Após as etapas de hibridação, as seqüências diferencialmente expressas serão amplificadas por PCR, podendo ser transferidas para vetores de clonagem, formando, então, uma biblioteca subtrativa de cDNA. Segundo Diatchenko et al. (1996), a hibridação subtrativa é uma técnica poderosa, usada para comparar duas populações de RNAm e obter clones de genes expressados em uma população e não na outra.

O método SSH é considerado eficiente e tem sido usado por vários pesquisadores. Zeng et al. (2006), utilizando a SSH, construíram uma biblioteca subtrativa de cDNAs de uma planta de mangue tolerante ao sal. Wong et al. (2007) isolaram 126 cDNAs relacionados à tolerância à salinidade em raízes de *Bruguiera cylindrica* (planta de mangue) por meio da SSH. Em tomate, Ouyang et al. (2007) identificaram genes envolvidos com resposta ao estresse salino. A prospecção de genes diferencialmente expressos em raízes de plantas sob estresse de alumínio foi realizada pela técnica SSH em milho por Tang (2005) e em trigo por Xiao et al. (2005). Genes relacionados ao alagamento em milho também foram isolados através da SSH por Zhang et al. (2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Germinação de sementes e estresse de Al

Duzentas sementes de milho (linhagens Cateto e L3), sorgo (linhagem SC 237) e arroz (cultivar Fernandes) foram desinfetadas com solução de cloro ativo [1%], colocadas em papel de germinação (J Prolab) umedecido com água destilada e germinadas em câmara de crescimento com temperatura controlada, a 27°C. Após quatro dias, as plântulas foram acondicionadas em bandejas e dispostas sobre um recipiente, de modo que suas raízes ficaram submersas em solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982 – Tabela 1), pH 4.0.

Após 24 horas em solução nutritiva, metade do número de plântulas foi transferido para os mesmos recipientes contendo a solução nutritiva completa + $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ e a outra metade permaneceu em solução nutritiva sem alumínio. Após quatro horas, substituiu-se a solução por água destilada, a fim de paralisar o estresse. Os níveis de alumínio utilizados foram de 222 μM , para milho; 148 μM , para sorgo e 555 μM , para arroz.

Os ápices das raízes dessas plantas foram, então, coletados (corte de 1cm) e colocados imediatamente em nitrogênio líquido e o RNA mensageiro foi extraído logo em seguida.

TABELA 1: Composição da solução nutritiva utilizada nos experimentos com milho, sorgo e arroz (Magnavaca, 1982).

Elem.	Fonte	g/L	mL esto/L	Solução nutritiva final		Composição		
				Mg elemento /L		Elem	mg/L	µM
				Cátion	Ânion			
Ca	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	270	3,08	Ca:11,1	NO ₃ ⁻ -N:98,6	Ca	141,1	3527
	NH ₄ NO ₃	33,8		NH ₄ ⁺ -N:18,2	NO ₃ ⁻ -N:18,2	K	90,1	2310
K	KCl	18,6	2,31	K:22,5	Cl:20,4	Mg	20,8	855
						NO ₃ ⁻ -N	152,0	10857
	K ₂ SO ₄	44,0		K:45,6	SO ₄ ⁻ -S:17,7	NH ₄ ⁺ -N	18,2	1300
	KNO ₃	24,6		K:22,0	NO ₃ ⁻ -N:7,9	P	1,4	45
Mg	Mg(NO ₃) ₂	142,4	1,54	Mg:20,8	NO ₃ ⁻ -N:24,0	S	18,8	587
						B	0,27	25
P	KH ₂ PO ₄	17,6	0,35	K:1,7	H ₂ PO ₄ ⁻ :1,4	Fé	4,3	77
						Mn	0,5	9,1
Fé	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	20,3	1,54	Fe:4,3	NO ₃ ⁻ -N:3,3	Cu	0,04	0,63
	HEDTA	13,4				HEDTA:0,26	Mo	0,08
Micro			0,77			Zn	0,15	2,29
Mn	MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,34		Mn:1,5	Cl:0,65	Na	0,04	1,74
B	H ₃ BO ₃	2,04			BO ₃ ⁻ -H:0,27	HEDTA	20,06	75
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,88		Zn:0,15	SO ₄ ⁻ -S:0,07			
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,20		Cu:0,04	SO ₄ ⁻ -S:0,02			
Mo	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,26		Na:0,04	MoO ₄ ⁻ -M:0,08			

3.2 Extração de RNA mensageiro (RNAm)

Para a extração do RNAm a partir do tecido, utilizou-se o kit *Quickprep micro RNAm purification*, conforme instruções do fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA).

3.3 Identificação dos genes diferencialmente induzidos pelo alumínio

Para a identificação dos genes induzidos pelo Al no ápice das raízes de linhagens de milho, arroz e sorgo tolerantes ao alumínio tóxico, sob condições de estresse, foi utilizado o processo de hibridação subtrativa seguida de PCR

supressivo (Diatchenko et al., 1996). Para esse procedimento, foi utilizado o *PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA) (Figura 2).

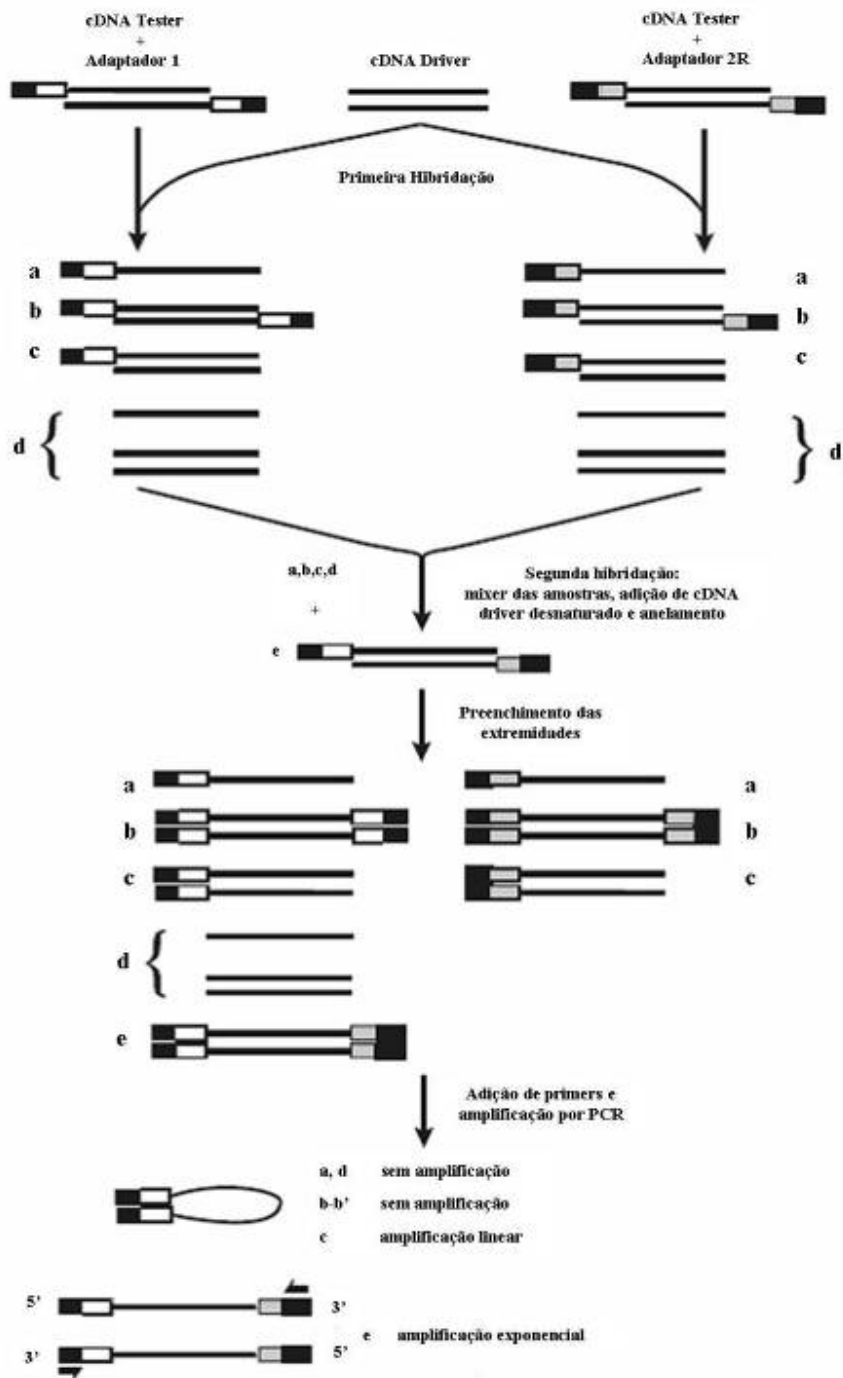


FIGURA 2 Esquema da hibridação subtrativa seguida de PCR. Adaptado de Diatchenko et al. (1996).

3.4 Síntese da primeira fita de cDNA

Para a síntese da 1ª fita de cDNA testes (fontes de genes na presença do estresse) e controles (mesmos genótipos utilizados pelo tratamento teste, contudo, na ausência do estresse), foram colocados, num microtubo, de 0,5ml estéril 4µl de RNAm (40µg) e 1µl do primer (10µM) e incubados, a 70°C, em termociclador PTC 200 (MJ Research, Massachusetts, EUA), por 2 minutos e resfriado em gelo por mais 2 minutos. Após a incubação, o conteúdo foi centrifugado rapidamente e adicionados 2µl do tampão da 1ª fita 5X, 1µl de mix dNTP (10mM cada), 1µl de água estéril e 1µl da enzima AMV transcriptase reversa (20 U/µl). A reação foi homogeneizada e incubada por 1 hora e 30 minutos, a 42°C. Após o tempo estipulado, os microtubos foram colocados em gelo para a finalização da síntese da 1ª fita de cDNA.

Para a síntese da 2ª fita de cDNA, foram adicionados aos microtubos de reação da 1ª fita dos cDNAs testes e controles 48,4µl de água estéril, 16µl de tampão da 2ª fita de cDNA, 1,6µl de mix dNTP (10mM) e 4µl do coquetel da enzima da 2ª fita (20X). A mistura foi, então, homogeneizada e incubada por 2 horas a 16°C, no termociclador. Após esse período, foram adicionados 2µl (6U) de T4 DNA polimerase e a mistura foi incubada, por 30 minutos, a 16°C, no termociclador. A reação da síntese da 2ª fita foi, então, finalizada com adição de 4 µL da mistura EDTA/glicogênio (20X). Para a limpeza dos cDNAs sintetizados, a mistura foi extraída uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e outra com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). À camada aquosa foram precipitados 40 µl de acetato de amônio 4M e 300 µl de etanol gelado 95% (v/v). O precipitado contendo o cDNA foi lavado em 500 µl de etanol gelado 80% (v/v) e secado a vácuo por 5 minutos.

O precipitado foi ressuspensionado em 50µl de água estéril e, então, armazenado, a -20°C. Para avaliação do rendimento e tamanho dos cDNAs

sintetizados, 6µl da mistura foram analisadas por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

Para a digestão com *RsaI* foram adicionados, em microtubo estéril, 43,5µl de cDNA, 5,0µl de tampão de restrição Rsa I e 1,5µl de enzima Rsa I (10 units/µl). A reação foi incubada a 37°C, por uma hora e meia. Foram separados 5µl da reação de digestão e colocados em gel de agarose para a avaliação da eficiência da enzima. Para finalizar, foram adicionados à reação 2,5µl de mix EDTA/glicogênio 20X, seguindo-se a extração de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se a 14.000 rpm, por 10 minutos. A fase aquosa foi precipitada com acetato de amônio e etanol gelado 95% (v/v) por centrifugação, o pellet lavado com etanol gelado e seco a vácuo por 5 minutos. O cDNA foi ressuspendido em 5,5µl de água estéril e armazenado a -20°C. A avaliação da eficiência da digestão com *Rsa I* foi feita por eletroforese em gel de agarose, comparando-se as amostras dos cDNAs sintetizados antes e depois da digestão. Os cDNAs testes foram divididos em duas alíquotas, tendo em uma sido ligado o adaptador 1 e na outra, o adaptador 2R, conforme Tabela 2.

TABELA 2: Relação dos componentes das reações de ligação dos adaptadores ao cDNA teste.

Componente	Reação 1	Reação 2
cDNA teste diluído	2µl	2µl
Mix de ligação (água estéril, tampão de ligação e T4 DNA ligase 400 unidades/µl)	6µl	6µl
Adaptador 1 (10µM)	2µl	-
Adaptador 2R (10µM)	-	2µl

A reação de ligação foi incubada a 16°C por uma noite, interrompida com 1 µl da mistura EDTA/glicogênio e a 72°C, por 5 minutos.

3.5 Híbridações

Foram realizadas duas híbridações, tendo a primeira sido feita conforme descrito na Tabela 3.

TABELA 3: Relação dos componentes da primeira hibridação.

Componente	Microtubo 1	Microtubo 2
cDNA controle ou driver	1,5µl	1,5µl
cDNA teste com adaptador 1	1,5µl	-
cDNA teste com adaptador 2R	-	1,5µl
Tampão de hibridação (4X)	4µl	4µl

As reações da primeira hibridação foram incubadas, a 98°C, por 90 segundos, no termociclador PTC 200 e, logo após, incubadas novamente, por 7 horas, a 68°C.

Na segunda hibridação, inicialmente, a população controle ou o driver (ápice de raiz do tratamento sem alumínio) foram desnaturados e 1 µl de tampão de hibridação (4X), 2 µl de água estéril e 1 µl de cDNA driver adicionado nos microtubos. A mistura foi incubada, por 90 segundos, a 98°C, em termociclador e as amostras do microtubo 1 foram misturadas com as do microtubo 2, resultados da primeira hibridação. A essa mistura, foi adicionado 1 µl do cDNA controle de ápice de raiz desnaturado. Esse passo foi feito rapidamente e os microtubos da primeira hibridação permaneceram no termociclador durante todo o tempo. A reação foi incubada, a 68°C, por uma noite. Para finalizar a segunda hibridação, foram adicionados 200 µl do tampão de diluição, homogeneizado, aquecido, a 68°C, por 7 minutos e os produtos obtidos armazenados a -20°C.

3.6 PCR supressivo (reação em cadeia da polimerase)

Com o objetivo de amplificar seqüências diferencialmente expressas, foi realizado um PCR supressivo. Para isso, foi preparada uma mistura contendo água estéril, tampão de reação de PCR 10X, 100 μ M de cada dNTP, 10 mM de oligonucleotídeo iniciador 1 e cDNA polimerase Advantage 50X, fornecida pelo *PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA). Foram transferidos 24 μ l da mistura para cada microtubo (tester e driver) e adicionado 1 μ l do cDNA tester em um microtubo, proveniente da segunda hibridação; em outro microtubo, preparou-se uma reação de PCR controle. Inicialmente, as reações foram incubadas em termociclador PTC 200, por 5 minutos, a 75°C, para estender o adaptador. Imediatamente iniciaram-se os ciclos de amplificação, sendo 94°C por 25 segundos; 27 ciclos a 94°C por 10 segundos; 66°C, por 30 segundos e 72°C, por 90 segundos. Antes de iniciar a segunda amplificação com “oligonucleotídeo iniciador nested”, a eficiência da primeira reação de PCR foi avaliada em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (1 μ g/ml), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene, CA, EUA).

A segunda amplificação foi realizada com o objetivo de reduzir os fragmentos inespecíficos e enriquecer ainda mais as seqüências diferencialmente expressas. Para isso, 3 μ l de cada reação do primeiro PCR foram diluídos em 27 μ l de água estéril. O restante foi armazenado a -20°C. A mistura do segundo PCR foi preparada com água estéril, tampão de PCR 10X, 10 μ M de oligonucleotídeo iniciador 1 “nested”, 10 μ M de oligonucleotídeo iniciador 2R “nested”, 100 μ M de cada dNTP e cDNA polimerase Advantage 50X. Dessa reação, foram transferidos 24 μ l para cada microtubo de PCR e adicionou-se 1 μ l do produto da primeira amplificação diluído, referente ao cDNA de cada amostra. O PCR utilizou 18 ciclos, a 94°C, por 10 segundos; 66°C, por 30

segundos e 72°C, por 30 segundos. Após os 18 ciclos, a mistura foi incubada a 72°C, por 7 minutos. Para avaliação e visualização dos produtos gerados, foram aplicados 8µl de cada reação em gel de agarose 2%, corou-se com brometo de etídio (1µg/ml), visualizou-se sob luz ultravioleta e digitalizou-se em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene). O restante da segunda reação de PCR foi armazenado a -20°C.

Após a segunda reação de PCR, os fragmentos amplificados foram clonados no vetor TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) e introduzidos na *E. coli* DH5α.

3.7 Seqüenciamento dos genes obtidos

Os cDNAs obtidos pelo processo de hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo foram seqüenciados, clonados no vetor topo e comparadas com seqüências depositadas no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>).

3.8 Construção de primers específicos

Foram construídos *primers* específicos para alguns dos genes obtidos, baseados nas seqüências publicadas para esses genes. A tabela com as seqüências desses *primers* encontra-se no item resultados e discussão.

3.9 RT – PCR

Foi realizado um RT – PCR com RNAs de arroz e milho, utilizando-se os *primers* específicos, com o objetivo de se obter seqüências completas de alguns genes. Para a reação de RT (transcriptase reversa), foi utilizado o kit “SuperScript™ III RNase H⁻ Reverse Transcriptase – Invitrogen”. De acordo com o protocolo desse kit, foram colocados num microtubo 1µl de Oligo dT, 15µl de RNA total e 1µl de dNTPs. Após a incubação, a 70°C, por 5 minutos foram acrescentados 4µl de tampão, 1µl de DTT (ditiotreitól), 1 µl de RNase

Out e 1µl da enzima transcriptase reversa (RT) e a reação foi então incubada, a 50°C, por 2 horas e a 70°C, por 15 minutos, em termociclador.

Para o PCR, foram colocados, num microtubo tampão de PCR 10X, 100µM de cada dNTP, 2mM de cloreto de magnésio, 0,2µM de cada um dos *primers* (reverse e forward), 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase, água estéril e 20ng de cDNA. A reação foi colocada num termociclador, a 94°C, durante 10 segundos; 50°C, por 10 segundos e 72°C, por 10 segundos, ao longo de 35 ciclos e extensão de 72°C, por 3 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Buscando comparar diferentes mecanismos de tolerância ao estresse de alumínio em três espécies de monocotiledôneas (arroz, milho e sorgo), genes induzidos pelo Al foram isolados dessas plantas por meio da técnica de hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo (Tabelas 4 a 10). A identificação das prováveis funções fisiológicas desses genes foi feita por meio do “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG, <http://www.genome.ad.jp/kegg>). Dentre as funções encontradas, destacam-se suas relações com a parede celular, transdução de sinais, tráfico de solutos, transportadores de membranas, mecanismos de tolerância a estresses abióticos e bióticos, genes relacionados à síntese de hormônios e manutenção da organização do citoesqueleto.

Guo et al. (2007) desenvolveram uma biblioteca subtrativa com genes induzidos pelo Al em linhagens de trigo tolerante. Nesse estudo, vários genes foram diferencialmente expressos. Esses autores concluíram que a tolerância ao Al pode ser co-regulada por múltiplos genes relacionados a vários mecanismos de tolerância.

TABELA 4 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de milho da linhagem Cateto 237 tratada com 222 µM de Al, por 1 hora.

Sequências identificadas por homologia BLAST no GenBank	Provável função fisiológica
Proteína 684 de <i>Mus musculus</i>	Semelhante à calmodulina. Proteína semelhante em levedura é expressa em condições de estresse oxidativo.
JEYF14 / 16 de <i>Rhizobium</i> sp.	Função desconhecida.
Metallopanstimulin de <i>Strongiloides ratti</i>	Metallopanstimulina é altamente expressa em células tumorais.
<i>Zea mays</i> 25S rRNA gene and transposon-like sequência	Função desconhecida.
Subunidade β da ATP sintase de milho/ ATP sintase mitocondrial	Induzida por alumínio em cultivar de trigo resistente a esse metal.
S-adenosylmethionina decarboxylase de milho	É uma das principais enzimas que regulam a biossíntese de poliaminas.
Cutinase	Hidrólise de cutina. Plantas com expressão ectópica de cutinase mostraram modificações ultra-estruturais na cutícula e aumento na permeabilidade de solutos.
ADP\ATP translocase	Relacionado ao estresse hídrico em batata.
Sec 14 de arroz	Secreção de proteínas do complexo de Golgi. Biossíntese de fosfolípidos.
Protein kinase de trigo	Algumas proteínas kinases de arroz estão envolvidas com resposta a estresse térmico
<i>Zea mays</i> 18S gene rRNA, menor subunidade	Função desconhecida.
<i>Xeronema callistemon</i> 18S gene rRNA	Função desconhecida.
<i>Panicum miliaceum</i> , mRNA para aspartato aminotransferase plastidial	Envolvido no metabolismo de nitrogênio em plantas
Arroz, gene ribossomal 25S	Função desconhecida.
Milho, proteína Heat shock de 70 kD	Possivelmente envolvida na sinalização de eventos de resposta ao estresse de calor
Sec61p de trigo	Proteína envolvida com o transporte de toxinas no complexo de Golgi.
26S rRNA	Função desconhecida.

TABELA 5 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de milho da linhagem Cateto 237 tratada com 222 µM de Al, por 4 horas.

Sequências identificadas por homologia BLAST no GenBank	Provável função fisiológica
<i>Zea mays</i> 25S rRNA e sequência semelhante a transposon	Função desconhecida.
Cutinase	Hidrólise de cutina. Plantas com expressão ectópica de cutinase mostraram modificações ultra-estruturais na cutícula e aumento na permeabilidade de solutos.
Gene Ampd3	Função desconhecida.
mRNA peptídeo de 21 kD	Função desconhecida.
ATP sulforilase	Função desconhecida.
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Em raízes de milho, é induzido por anaerobiose e calor. Em trigo, está associado ao estresse causado por deficiência de ferro
mRNA para S-adenosylmethionine decarboxylase	É uma das principais enzimas que regulam a biossíntese de poliaminas.
Mrna para metallopanstimulin/gene JEYF 14 para 16S rRNA	A metalopastimulina é altamente expressa em células tumorais
Precursor da cadeia alfa peptidase (DGMPP)	Envolvido com a produção de peptidases.
Proteína semelhante a DNA J	Função desconhecida.
Proteína de membrana, Omp1	Expressão aumentada por hipoxia em <i>Camamonas acidovorans</i> .

TABELA 6 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de milho da linhagem L3 tratada com 222 µM de Al, por 1 hora.

Sequências identificadas por homologia BLAST no GenBank	Provável função fisiológica
<i>Zea mays</i> gene 25S rRNA e sequência semelhante a transposon	Função desconhecida.
Beta-ketoacyl redutase (gl8)	Produção de ceras cuticulares.
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH (gpc4)	GAPDH é sintetizada em raízes de milho em condições de anerobiose.

<i>Mus musculus</i> , proteína 684 (gene mg684)	Semelhante à calmodulina.
<i>Strongiloides ratti</i> , mRNA para metalopanstimulina	Metalopanstimulina é altamente expressa em células tumorais
Arroz, gene 25S ribossomal RNA	Função desconhecida.
Calreticulina	No ápice das raízes de milho está localizada nas células periféricas, envelopes nucleares e estruturas citoplasmáticas. No estresse osmótico acumula-se no plasmodesmata enriquecido com calose e desaparece do protoplasma.. Proteína acumuladora de Ca ⁺² , o qual se torna disponível em períodos de estresse.
mRNA para fator auxiliar U2 snRNP	Proteína envolvida no "splicing" de pré-mRNA
PSI sistema de antena - clorofila a/b	Expressão aumentada em plantas sob estresse de radiação UV-B. Expressão diminuída em plantas de arábidoopsis sensíveis ao Al, quando cultivadas sob estresse deste mineral.
Cutinase	Função desconhecida.

TABELA 7 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de milho da linhagem L3 tratada com 222 µM de Al, por 4 horas.

Sequências identificadas por homologia BLAST no GenBank	Provável função fisiológica
Sec 14 de arroz	Secreção de proteínas do complexo de Golgi. Biossíntese de fosfolípidos.
Catepsina B de trigo	Tem expressão aumentada em tecidos submetidos a ferimento.
<i>Zea mays</i> , gene 25S rRNA	Função desconhecida.
Milho, gene 26S rRNA mitocondrial	Função desconhecida.
JEYF14 de <i>Rhizobium sp</i>	Função desconhecida.
<i>Mus musculus</i> , proteína 684 (gene mg684)	Semelhante à calmodulina. Proteína semelhante em levedura é expressa em condições de estresse oxidativo
Cutinase	Hidrólise de cutina. Plantas com expressão ectópica de cutinase mostraram modificações ultra-estruturais na cutícula e aumento na permeabilidade de solutos.
rRNA 16S de <i>Rhizobium sp.</i>	Função desconhecida.
Proteína ribossomal S9RPS6-1	Função desconhecida.
Transportador de fosfato mitocondrial	Carregador de íons fosfato.

TABELA 8 - Seqüências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de sorgo da linhagem SC 283 tratada com 148 µM de Al, por 1 hora.

Seqüência com homologia BLAST	Provável função fisiológica
<i>Zea mays</i> PCO085932 mRNA	Cutinase - <i>Maize Mapping Project/DuPont Consensus Sequences for Design of Overgo Probes</i>
<i>Dianthus caryophyllus</i> , mRNA de proteína semelhante a MtN3	Moscas transgênicas de <i>Drosophila melanogaster</i> com duas cópias do alelo MtN3 de metalotioneína são mais tolerantes ao cádmio que moscas com somente uma cópia.
<i>Zea mays</i> CL2281_1 mRNA	<i>Maize Mapping Project/DuPont Consensus Sequences for Design of Overgo Probes</i>
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA de 3'UTR, clone nh13.4	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Setaria italica</i> , mRNA de actina	Proteção da parede celular, relacionado com várias fontes de estresse.
<i>Dianthus caryophyllus</i> , mRNA de proteína semelhante a MtN3	Moscas transgênicas de <i>Drosophila melanogaster</i> com duas cópias do alelo MtN3 de metalotioneína são mais tolerantes ao cádmio que moscas com somente uma cópia.
Clathrin, cadeia pesada	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i>
<i>Nicotiana sylvestris</i> , gene Nspcc3, atividade quinase em fosfoenolpiruvato carboxilase	Confere tolerância a estresse salino em folhas de sorgo.
<i>Saccharum</i> , cultivar CP72-2086, fator de alongamento 1 alfa (SEF1a)	Diferencialmente regulado em folhas e raízes de plantas sob estresse de frio
<i>Zea mays</i> CL2935_1 mRNA	<i>Maize Mapping Project/DuPont/não publicado</i>
<i>Zea mays</i> , mRNA para sintase da celulose-1 (CesA-1)	Responsivo ao estresse mecânico em <i>Aspen</i> .
<i>Zea mays</i> CL2935_1 mRNA	Cutinase - <i>Maize Mapping Project</i> .
<i>Zea mays</i> PCO096715 mRNA	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Zea mays</i> PCO124171 mRNA	<i>Maize Mapping Project</i>
<i>Zea mays</i> PCO087051 mRNA	<i>Maize Mapping Project</i>
<i>Zea mays</i> PCO114889	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .

<i>Zea mays</i> PCO142929 mRNA	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Arabidopsis thaliana</i> , fibrillarín 2 (AtFib2)/ <i>Zea mays</i> PCO102583	cDNA induzido por patógeno (PI1) em <i>Sorghum bicolor</i> /induzido por estresse de água e em plantas cultivadas no escuro.
<i>Zea mays</i> , CL253_2 mRNA/ <i>Zea mays</i> PCO097531	Cutinase - <i>Maize Mapping Project</i> .
<i>Hordeum vulgare</i> L. (Alexis), mRNA para serine carboxipeptidase II-2/ <i>Zea mays</i> PCO069672 mRNA	Atividade induzida por ácido giberélico.
<i>Saccharum</i> , cultivar H32-8560, gene ubi9, poliubiquitina	Poliubiquitina.
<i>Zea mays</i> PCO064714 mRNA	<i>Maize Mapping Project/DuPont/unpublished</i>
<i>Zea mays</i> , mRNA para adenosina cinase/ <i>Zea mays</i> PCO064637 mRNA	Atividade da ADK aumenta significativamente em extratos de folha de espinafre submetida a estresse salino.
<i>Zea mays</i> PCO135520 mRNA sequence	<i>Maize Mapping Project/DuPont/unpublished</i>
<i>Zea mays</i> PCO131201 mRNA sequence	<i>Maize Mapping Project/DuPont/unpublished</i>
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA parcial	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>P.miliaceum</i> mRNA para aspartato aminotransferase (pcAAT2)	Metabolismo de nitrogênio.
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA para 3'UTR/ <i>Zea mays</i> CL7841_1 mRNA	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i>
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA para 3'UTR	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Zea mays</i> PCO135520	<i>Maize Mapping Project</i>
<i>Saccharum</i> , cultivar CP72-2086, fator de alongamento 1 alfa (SEF1a)	A expressão do EF-1 alfa é diferencialmente regulada em raízes e folhas sob estresse de frio.
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA para 3'UTR	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Zea mays</i> , PCO067271 mRNA	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
<i>Atropa belladonna</i> , mRNA para 3'UTR	Gene diferencialmente expresso em galhas de folha em <i>Atropa belladonna</i> .
HSEF1AC, mRNA para fator de alongamento 1-alfa, humano	A expressão do EF-1 alfa é diferencialmente regulada em raízes e folhas sob estresse de frio.

<i>Saccharum</i> , cultivar C2H2 mRNA para proteína serrate (Msn2p)	O gene Msn2p e o fator parcialmente redundante Msn4p regulam a expressão de genes de tolerância a estresse em <i>S. cerevisiae</i> . Eles são necessários para a transcrição de vários genes codificando proteínas de proteção a estresses.
<i>Homo sapiens</i> , mRNA expresso no "placental villi"	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO071606 mRNA	<i>Maize Mapping Project</i>
<i>Zea mays</i> PCO067271 mRNA	<i>Maize Mapping Project</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i> , dihydroflavonol reductase/ <i>Zea mays</i> PCO119463	Gene induzido por cálcio, sacarose e luz.

TABELA 9 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de sorgo da linhagem SC 283 tratada com 148 µM de Al, por 4 horas.

Sequências identificadas por homologia BLAST no GenBank	Referências no GenBank
<i>Solanum tuberosum</i> RiCDPK2, mRNA para cinase dependente de cálcio	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11516152&dopt=Abstract
<i>Zea mays</i> , gene 25S rRNA e sequencia semelhante a trasnposon	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=13397940&dopt=GenBank
<i>Zea mays</i> CL644_1 mRNA	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=21213476&dopt=GenBank
<i>Zea mays</i> , gene 26S rRNA mitocondrial	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=00342661&dopt=GenBank
<i>Zea mays</i> , mRNA para PCO073639	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=21209103&dopt=GenBank
Alfa Kafirina de <i>Sorghum bicolor</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=Nucleotide&list_uids=03687422&dopt=GenBank

TABELA 10 - Sequências putativas referentes a genes induzidos por Al no ápice da raiz de arroz da cultivar Fernandes tratada com 555 μ M de Al, por 1 hora.

Resultado do Blast	Provável função fisiológica
<i>Atropa belladonna</i> partial mRNA, 3'UTR	Expressão diferencial do gene em folhas de <i>Atropa belladonna</i> .
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH mRNA	GAPDH catalisa um passo importante na produção de energia no metabolismo dos carboidratos.
<i>Enterococcus faecium</i> Efae_9	Proteína hipotética.
<i>Homo sapiens</i> creatine kinase muscle (CKM), mRNA	Catalisa reversivelmente a transferência de fosfato entre o ATP e vários fosfógenos (p.ex. creatina fosfato). Isoenzimas da creatina quinase iniciam um papel central na transdução de energia em tecidos.
<i>Homo sapiens</i> interphotoreceptor matrix proteoglycan 200 (IMPG2)	O interfotoreceptor de matrix proteoglicano-2 faz parte de um complexo extracelular em tecido ocular.
Homo sapiens mRNA para squalene epoxidase	Squalene epoxidase catalisa o primeiro passo de oxigenação na biossíntese de esterol.
<i>Homo sapiens</i> palmitoyl-protein thioesterase 2 (PPT2)	Enzima relacionada ao metabolismo dos ácidos graxos.
<i>O. sativa</i> mRNA para 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Biossíntese do etileno.
<i>O. sativa</i> mRNA para alpha-tubulin (clone OSTA-136)	A tubulina constitui os microtúbulos. Subunidade: dímer de cadeias alpha e beta. Existem 6 genes que codificam para alpha-tubulina.
<i>O. sativa</i> Rrl5 mRNA para 5S ribosomal RNA	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> gene para plastidic ATP sulfurylase	Relacionado à assimilação de sulfato, levando à biossíntese de metionina e cisteína.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mitochondrial DNA, section 2/2	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para ADP-ribosylation factor	Envolvida no tráfico de proteínas.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para GTP binding protein (rgp2)	Pertence a subfamília <i>rab</i> .

<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para homólogo de Tat binding proteína	Símbolo alternativo: Rpt5. Similaridade: pertence à família das ATPases.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para transportador de fosfato mitocondrial	Induzido sob deficiência de fosfato.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para peroxidase	Remoção de radicais livres, biossíntese e degradação da lignina, metabolismo das auxinas.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) mRNA para thionin Osth1	Aumentou a resistência a doenças bacterianas em sementes transgênicas de aveia superproduzindo tionina.
<i>Oryza sativa</i> UXS-2 mRNA para UDP-glucuronic acid decarboxylase	UDP-xilose é um açúcar requerido para a síntese de estruturas glicanas em animais, plantas, fungos e bactérias. A biossíntese da UDP-xilose é mediada pela UDP-glucuronic acid decarboxylase, que converte UDP-glucuronic acid a UDP-xilose.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) V-ATPase B gene for vacuolar ATPase B subunit	Indução da ATPase vacuolar e ATP sintase mitocondrial pelo alumínio em cultivar de trigo resistente ao Al.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 1	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 10	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 6	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 7	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group), chromosome 8	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> proteína induzida por estresse e ácido abscísico (Asr1)	Gene relacionado ao ácido abscísico (ABA); participa de processos fisiológicos, tais como respostas de folhas e raízes ao estresse hídrico.
<i>Oryza sativa</i> beta-expansina (EXPB6) mRNA	Relacionado com parede celular de plantas.
<i>Oryza sativa</i> beta-glucosidase mRNA	A beta-glucosidase está envolvida não somente na hidrólise, mas também na modificação de oligossacarídeos na parede celular de sementes de arroz.
<i>Oryza sativa</i> chromosome 10 BAC OSJNBa0015J15 genomic sequence	Função desconhecida.

<i>Oryza sativa</i> enolase mRNA	Catalisa a reação de conversão do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato na rota glicolítica
<i>Oryza sativa</i> gene para ovp1-H ⁺ -translocamento da pirofosfatase inorgânica em arroz	H ⁽⁺⁾ -translocamento da pirofosfatase inorgânica (H ⁽⁺⁾ -PPase): enzima modelo para pesquisas de mecanismos de acoplamento entre a hidrólise da pirofosfatase e o transporte ativo de prótons. Em células de plantas, H ⁽⁺⁾ -PPase co-existe com H ⁽⁺⁾ -ATPase na membrana vacuolar.
<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4	Função desconhecida.
<i>Oryza sativa</i> hemoglobin 1 mRNA	Pode atuar como sensor de oxigênio ou iniciar um importante papel na transferência de elétrons. Expressado em raízes e folhas de rosetas. Indução por baixa de oxigênio.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para calcium-binding protein (calreticulina)	A calreticulina é uma proteína multifuncional que armazena Ca (2+) no lúmen do retículo endoplasmático. É também encontrada no núcleo, sugerindo que pode atuar na regulação da transcrição. A calreticulina está presente na cultura de células de arroz e age na regulação do desenvolvimento durante a regeneração dessas células.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para EF-1 alpha	Síntese de proteínas. A expressão da EF-1 alpha é diferencialmente regulada em folhas e raízes sob estresse de frio.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para fator de alongação beta'	Síntese de proteínas.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para Ran	A proteína RAN está relacionada a respostas ao frio em trigo.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para proteína RGP2	Polipeptídeos glicosilados reversíveis (RGPs) relacionam-se com a biossíntese de polissacarídeos. Em plantas, essas proteínas podem atuar na síntese da parede celular.
<i>Oryza sativa</i> mRNA para threonyl-tRNA synthetase	Síntese protéica.
<i>Oryza sativa</i> NADP-Isocitrato desidrogenase específica - mRNA	NADP-isocitrato desidrogenase é uma enzima citosólica vinculada ao metabolismo do C e do N em plantas.

<i>Oryza sativa</i> proteína relacionada à patogenicidade 1 mRNA	Expressão dos genes PR-1 foi induzida por infecções bacterianas e fúngicas em arroz.
<i>Oryza sativa</i> S-adenosil-L-metionina sintetase (pOS-SAMS2) mRNA (Metionina adenosiltransferase 2)	Catalisa a formação da s-adenosilmetionina da metionina e ATP. Os genes SAMS de arroz são diferencialmente regulados por estresse salino.
<i>Oryza sativa</i> sec14 proteína mRNA	Secreção de proteínas do complexo de Golgi. Biossíntese de fosfolipídeos.
<i>Oryza sativa</i> tonneau 1 (TON1) mRNA	Os genes tonneau 1 definem uma nova classe de proteínas de plantas associadas com a citoesqueleto.
<i>Oryza sativa</i> Wilms' – proteína relacionada a tumor QM mRNA	Proteína supressora de tumor.
<i>Oryza sativa</i> , cromossomo 3	Função desconhecida.
Arroz (YK426) mRNA	Pertence à família l6p de proteínas ribossomais.
Arroz 25S ribossomal RNA gene	Função desconhecida.
Arroz DNA para aldolase C-1	A expressão do gene aldolase C-1 é regulada por meio de rotas de sinais de transdução envolvendo o Ca ²⁺ .
Arroz gene para fenilalanina amônia-liase (Ospal)	Enzima chave do metabolismo de plantas; catalisa a primeira reação da biossíntese de l-fenilalanina.
Arroz mRNA EN194, seqüência parcial	Homóloga à proteína ribossomal S15.
Arroz mRNA EN486	Homólogo à proteína ribossomal L17, associada com o metabolismo dos aminoácidos.
Arroz mRNA para ADP/ATP translocase	Catalisa a troca de ADP e ATP por meio da membrana interna. Considerado o componente central da transição da permeabilidade mitocondrial.
Arroz mRNA para cyc07	A expressão desse gene é maior em calos do que em plântulas e é regulado por fatores externos, tais como alta pressão osmótica, salinidade, baixa temperatura e alagamento.
Arroz mRNA para fructose-difosfato aldolase	Enzima que catalisa reversivelmente a clivagem da fructose 1,6-bifosfato para gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e diidroxiacetona fosfato (DHAP).

Arroz mRNA para gamma-Tip	Gamma-TIP (proteína intrínseca do tonoplasto) está relacionada com o controle de água dentro dos vacúolos durante a expansão celular.
Arroz mRNA, homologia parcial com o gene chaperonina 10	Chaperoninas são classes de proteínas que facilitam o dobramento de outras proteínas. Em arábida, a chaperonina 10 é uma proteína que se liga à calmodulina.
Rice mRNA, sequência homologous to acidic ribosomal protein P2 gene	Possui um importante papel na síntese proteica.
<i>Triticum aestivum</i> beta-D-glucano exohidrolase - mRNA	Atividade catalítica. Similaridade: pertence à família 3 do glicosil-hidrolases.
<i>Triticum aestivum</i> poly (A)- proteína ligada (wheatpab) mRNA	Atua na terminação da tradução.
<i>Triticum aestivum</i> S-adenosil-L-homocisteína hidrolase	Inibidor competitivo de s-adenosyl-L-methionine-dependente metiltransferase ; controla metilações via regulação da concentração intracelular de adenosil-L-homocisteína.
<i>Zea mays</i> 25S rRNA gene e transposon	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> álcool desidrogenase 1 (adh1) gene, adh1-F allele	Envolvida no metabolismo dos carboidratos.
<i>Zea mays</i> celulose sintase-9 (CesA-9) mRNA	Síntese de celulose.
<i>Zea mays</i> CL2935_1 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> CL7841_1 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> CL9211_1 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO061367 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO068622 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO086432 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO095526 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO101267 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO111730 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO117401 mRNA	Função desconhecida.

<i>Zea mays</i> PCO118979 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO126068 mRNA	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO135520 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO135925 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> PCO145462 mRNA sequência	Função desconhecida.
<i>Zea mays</i> profilina 5 (PRO5) mRNA	Em altas concentrações, a profilina impede a polimerização da actina.

Foram identificados 48 genes em plantas de milho das linhagens Cateto 237 e L3, tratadas com 222 μM de Al por uma e quatro horas; 46 genes em plantas de sorgo da linhagem SC 283 tratadas com 148 μM de Al por uma e quatro horas e 81 genes em plantas de arroz da cultivar Fernandes tratadas com 555 μM de Al por uma hora (Tabela 11).

TABELA 11 - Número de cDNAs encontrados nas bibliotecas de milho, sorgo e arroz expostos a diferentes concentrações de alumínio e tempo de exposição.

Espécie	Al (μM)	Tempo de exposição (hora)	Nº de cDNAs na biblioteca
Milho (Cateto 237)	222	1	17
		4	11
Milho (L3)	222	1	10
		4	10
Sorgo (SC 283)	148	1	40
		4	6
Arroz (Fernandes)	555	1	81

Os cDNAs de todas as bibliotecas foram separados por categorias, de acordo com as suas prováveis funções biológicas e fisiológicas encontradas no KEGG (Tabela 12).

TABELA 12 - Categorização das seqüências de todas as bibliotecas, de acordo com suas funções biológicas.

Categorização	Nº de cDNAs	%
Estrutura celular	39	22
Metabolismo	38	22
Sinais de transdução	15	9
Tráfego de solutos	10	6
Transportadores de membrana	9	5
Transcrição	4	2
Funções desconhecidas	60	34

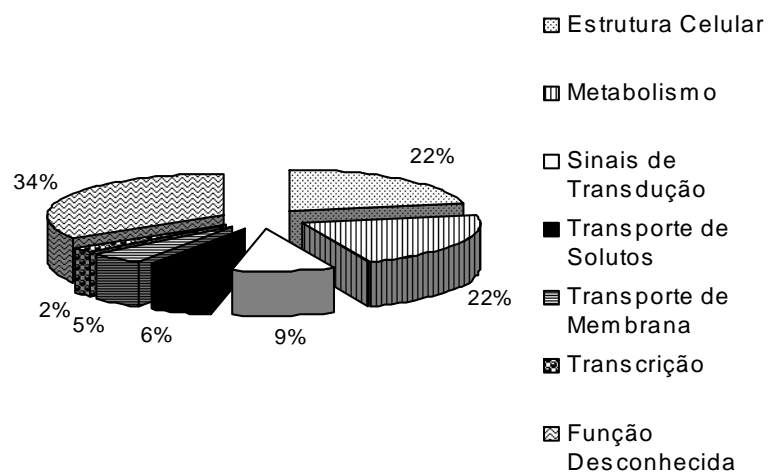


FIGURA 1 - Percentual dos cDNAs das bibliotecas, de acordo com a categorização de suas seqüências.

Dentre os genes encontrados, 44% apresentaram funções relacionadas com estrutura celular e metabolismo. Funções ligadas a sinais de transdução, transporte de solutos, transporte de membranas e transcrição gênica foram encontradas em 22% dos genes. Não foram identificadas as funções biológicas em 34% dos genes (Figura 1).

A partir dos cDNAs encontrados em todas as bibliotecas, dez foram escolhidos como genes candidatos, baseados em suas possíveis funções biológicas e relação com diferentes estresses abióticos (Tabela 13). Esses foram, então, selecionados para montagem dos cassetes gênicos que serão utilizados para a transformação genética de milho.

TABELA 13 - Genes candidatos obtidos nos experimentos de prospecção de genes induzidos por Al em ápices de raízes de linhagens tropicais de arroz, milho e sorgo, para serem utilizados na confecção dos cassetes gênicos de transformação. Na 3ª coluna, aparece o link para o site do NCBI e na 4ª coluna uma breve descrição das prováveis funções destas sequências. Observa-se que, com exceção da ATP sintase mitocondrial e da beta subunidade da ATPase vacuolar, o papel dos outros genes na tolerância ao Al ainda não foi estabelecido.

Genes candidatos	Espécies que apresentaram	Link no NCBI	Provável função biológica descrita no link NCBI
Cutinase	Milho e sorgo	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11217409&dopt=Abstract http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10810146&dopt=Abstract	Hidrólise de cutina, modificando as propriedades físicas da parede celular, possivelmente tornando-a mais permeável.
ADP\ATP translocase	Arroz e milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=10898447&dopt=Abstract	Relacionado ao estresse hídrico em batata.
Subunidade β da ATP sintase de milho/ ATP sintase mitocondrial	Milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11299386&dopt=Abstract	Induzida por alumínio em cultivar de trigo resistente a este metal.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – GAPDH	Arroz e milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utills/ref.fcgi?http://www.plantphysiol.org/cgi/pmidlookup?view=full&pmid=11351090 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9037163&dopt=Abstract http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=8616225&dopt=Abstract	Em raízes de milho é induzido por anaerobiose e calor. Em trigo, está associado ao estresse causado por deficiência de ferro.
Sec 14 de arroz	Arroz e milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1829728&dopt=Abstract http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11551069&dopt=Abstract http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9874205&dopt=Abstract	Secreção de proteínas do complexo de Golgi. Biossíntese de fosfolipídeos.
mRNA para calreticulina	Arroz e milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11706198&dopt=Abstract http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11874098&dopt=Abstract	A expressão ectópica de calreticulina aumenta as reservas de Ca na célula, o qual pode ser utilizado em múltiplas funções metabólicas.
Gene da Beta-ketoacyl reductase (gl8)	Milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11891248&dopt=Abstract	Produção de ceras cuticulares.
mRNA para aspartato aminotransferase	Milho e sorgo	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/utills/qmap.cgi?uid=95251377&form=6&db=m&Dopt=r	Enzima chave interligando os metabolismos de carbono e nitrogênio em plantas tipo C4.
ATPase vacuolar, beta subunidade	Arroz	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11299386&dopt=Abstract	Induzida por alumínio em cultivar de trigo resistente a esse metal.
Transportador de fosfato mitocondrial	Arroz e milho	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11233258&dopt=Abstract	Proteína transportadora de fósforo, induzida sob deficiência de fósforo no meio de cultivo

4.1 Cutinase

A cutícula é um componente estrutural da parte aérea das plantas e seu principal constituinte é a cutina. A cutina é um biopoliéster insolúvel que forma uma barreira protetora entre as plantas e o ambiente, evitando a dessecação e a entrada de patógenos. A cutinase é uma enzima que catalisa a hidrólise da cutina, sendo produzida por fungos fitopatogênicos para facilitar sua entrada no hospedeiro.

Sieber et al. (2000) geraram plantas transgênicas de *Arabidopsis* que expressaram o gene da cutinase do fungo *Fusarium solani*. Segundo esses autores, essas plantas apresentaram alterações na estrutura da cutícula e aumento na permeabilidade a solutos.

4.2 ADP/ATP translocase mitocondrial

O ADP/ATP translocase é um transportador de ADP e ATP ou translocador de adenina nucleotídeo, uma proteína localizada na membrana interna das mitocôndrias que media a troca, entre citoplasma e mitocôndrias, de ADP e ATP (Cai et al., 1997).

A seqüência de um clone de cDNA para ADP/ATP translocase em milho foi isolada por Baker & Leaver (1985). Por meio de análises dessa seqüência, esses autores mostraram homologias com transportadores polipeptídicos de fungo e boi.

Fратиanni et al. (2001) mostraram que houve um aumento na atividade dos transportadores de ADP/ATP em células de batata adaptada ao estresse hídrico. Esse resultado sugere que a adaptação da mitocôndria a esse estresse provoca um aumento na permeabilidade da membrana.

Hashimoto et al. (1993) mostraram que ocorreu um aumento na expressão do gene ADP/ATP translocase em plantas de arroz expostas a baixas temperaturas (10°C) e ao estresse salino (2% de NaCl) por 24 horas.

4.3 ATP sintase mitocondrial e ATPase vacuolar

A ATP sintase é um tipo de ATPase que hidrolisa ATP e bombeia prótons H^+ através da membrana interna mitocondrial. A ATPase vacuolar é responsável pelo bombeamento de H^+ e pela acidificação do interior dos vacúolos vegetais.

Hamilton et al. (2001) analisaram a atividade da ATPase vacuolar e da ATP sintase mitocondrial, sob estresse de alumínio, em cultivares de trigo sensível e tolerante. Seus resultados mostraram que a cultivar tolerante foi o único a apresentar atividade de ambas as ATPases. Eles concluíram que a ATPase vacuolar respondeu especificamente ao estresse de Al e que a ATP sintase mitocondrial forneceu o ATP requerido, mantendo, assim, o balanço energético dentro da célula.

4.4 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma enzima presente nos cloroplastos e no citosol que catalisa reversivelmente a oxidação e a fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato durante o ciclo de Calvin e a glicólise. Em milho, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase citosólica (GapC) é codificada por uma pequena família multigênica, composta por *gpc1*, *gpc2*, *gpc3* e *gpc4* (Manjunath & Sachs, 1997).

Em arábidoopsis, os níveis de RNA mensageiro de GapC foram aumentados quando a planta foi submetida ao choque térmico, anaerobiose e aumento de sacarose (Yang et al., 1993). Em raízes de milho sob anaerobiose, ocorre um aumento dos níveis transcricionais dos genes *gpc3* e *gpc4* (Russel & Sachs, 1989; Manjunath & Sachs, 1997).

4.5 Sec 14

A proteína Sec 14 faz parte de um grupo chamado PITPs (proteínas que transferem fosfatidilinositol), que transporta fosfatidilinositol ou fosfatidicolina

entre membranas durante o tráfico vesicular, em seres eucariotas (Allen-Baume et al., 2002).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína Sec 14 atua na formação e na saída de vesículas secretórias do complexo de Golgi (Bankaitis et al., 1989). As proteínas Ssh1 e Ssh2 de soja (Monks et al., 2001) e AtSEC14 de *Arabidopsis* (Jouannic et al., 1998) apresentam similaridades com a Sec14 de fungo (Kapranov et al., 2001).

4.6 Calreticulina

A calreticulina é uma proteína multifuncional que liga ao cálcio - Ca^{+2} , presente no retículo endoplasmático de células eucarióticas (Navazio et al., 1996). De acordo com Michalak et al. (1999), uma das principais funções da calreticulina é a regulação homeostática de Ca^{+2} . Em plantas, o cálcio atua como mensageiro secundário no acoplamento dos estímulos extracelulares com as respostas intracelulares (Sanders et al., 1999).

Para determinar se estoque de cálcio do retículo endoplasmático afeta a resposta das plantas ao estresse, Wyatt et al. (2002) usaram o gene da calreticulina de milho para transformar plantas de *Arabidopsis*. Os autores concluíram que as plantas transgênicas tiveram o estoque de cálcio aumentado, devido ao gene da calreticulina e que essas plantas eram capazes de acessar esse estoque sob condições de estresse.

4.7 Beta Ketoacil Redutase (GL8)

Em milho, o gene GL8 codifica a β -ketoacil redutase durante o alongamento de uma longa cadeia de ácidos graxos, requerida para a produção de ceras cuticulares nas folhas (Xu et al., 1997). As ceras cuticulares das folhas, além de funcionarem como barreiras para água e solutos, protegem a planta contra estresses bióticos e abióticos (Beattie & Marcell, 2002).

4.8 Aspartato aminotransferase

A enzima aspartato aminotransferase (AST) participa do metabolismo de nitrogênio e carbono e do ciclo fotossintético de plantas C₄, catalisando a reação reversível do oxaloacetato + glutamato \Leftrightarrow aspartato + α -cetogluturato.

Schultz & Coruzzi (1995) estudaram os genes e isoenzimas para aspartato aminotransferase presentes em *Arabidopsis*. Nesse estudo, foram encontrados quatro genes distintos (ASP1 – ASP4) que codificam proteínas que atuam em compartimentos celulares diferentes.

Em arroz, Song et al. (1996) encontraram 15 clones de cDNA codificando para aspartato aminotransferase.

4.9 Transportador de fosfato mitocondrial

O transportador de fosfato mitocondrial, localizado na membrana interna das mitocôndrias, é uma proteína de transporte ativo de fosfato inorgânico (P_i). O fosfato é adquirido pelas células das raízes e transportado para folhas jovens através do xilema. Sob deficiência de fósforo, como, por exemplo, em solos ácidos, a elevada afinidade do sistema de transporte é considerada um principal mecanismo para assimilação de P_i pelas raízes (Ming et al., 2005).

Mitsukawa et al. (1997) mostraram que a superexpressão do gene PHT1, de *Arabidopsis*, em plantas transgênicas de tabaco aumentou a taxa de assimilação de fósforo, elevando também a produção da biomassa sob condições limitadas de fosfato.

4.10 RT – PCR (transcriptase reversa)

Por meio de ensaios de RT-PCR foi possível identificar seqüências completas de alguns dos 10 genes candidatos. Os *primers* utilizados nesses ensaios foram desenhados de acordo com seqüências publicadas para milho e arroz.

Considerando o primeiro conjunto de pares de *primers* (Tabela 13), foi possível a obtenção das seqüências completas para os genes ADP/ATP translocase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e transportador de fosfato mitocondrial. Mediante RT-PCR, foi possível observar a expressão desses genes (Figura 3).

TABELA 13 - Primeiro conjunto de *primers* desenhados a partir de seqüências publicadas para milho no Genbank.

GENE	PRIMER	Nº DE BASES
Cutinase 5'	AAA GGA TCC ATG GGT CAC GAC GAG ATC	27
Cutinase 3'	CTT GGT ACC GAG CTC GGA TCC ACT AG	26
ATPase 5'	AAA GGA TCC ATG GGT CTG GTG AAG GAT G	28
ATPase 3'	AAA GGA TCC CAT CGC AGT TTA TTG TTC CAT C	31
Aspartato aminotransferase 5'	AAA GGA TCC ATG GCT TCC GCC GCC TTC	27
Aspartato aminotransferase 3'	AAA GGA TCC GGC GCA GGG CGC AAT TAA C	28
G3P desidrogenase 5'	AAA GGA TCC ATG GCC AAG ATC AAG ATC GG	29
G3P desidrogenase 3'	AAA GGA TCC GAG TGA ACT GAT TTG ATT AAA AG	32
ADP/ATP translocase Milho 5'	AAA GGA TCC ATG CAG ACC CCG CTC TGT G	28
ADP/ATP translocase Milho 3'	AAA GGA TCC AGG ATA GTT ACG AGT GTT TGG AG	32
Sec 14 – 5'	AAA GGA TCC ATG GCG GGC AAC AGA GG	26
Sec 14 – 3'	AAG GAT CCG GGA ATA CTT TAT TAT AAA TTT ATA C	34
Calreticulina 5'	AAA GGA TCC GCC GGT ATG GCG ATC	24
Calreticulina 3'	AAA GGA TCC GAA CCT AAA CTC GCC GC	26
Beta - keto acil redutase 5'	AAA GGA TCC ATG GCC GGC ACG TGC GC	26
Beta - keto acil redutase 3'	AAA GGA TCC GCA CAA CTT CTT CAA GTT AAT TTC	33
Transportador de P 5'	AAA GGA TCC ATG GCG CTC TCC GAC CG	28
Transportador de P 3'	TAA GGA TCC GCA CTC TTT CAT AAA GAC CAT AAT G	34
ATP sintase 5'	AAA GGA TCC ATG GCG TCC CGC CGG G	25
ATP sintase 3'	AAA GGA TCC AAC CGA ACA GGG AGG AAC	27

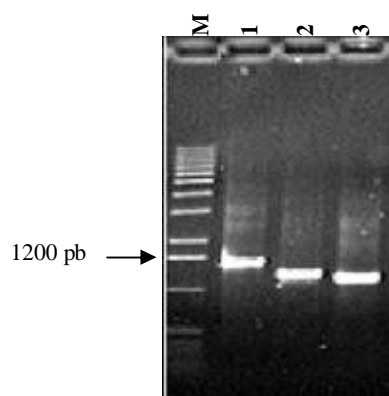


FIGURA 3: Gel de RT-PCR utilizando o primeiro conjunto de pares de primers descritos na Tabela 13. M: Marcador Molecular 1Kb; 1: ADP/ATP translocase, 2: transportador de fosfato mitocondrial e 3: GAPDH.

Com um segundo conjunto de pares de *primers* (Tabela 14), foi possível obter seqüências completas para os genes ADP/ATP translocase, calreticulina, aspartato aminotransferase, Sec 14, ATPase vacuolar e cutinase. A expressão gênica foi observada no gel de agarose como produto do RT-PCR (Figuras 4, 5 e 6).

TABELA 14 – Segundo conjunto de *primers* desenhados a partir de seqüências publicadas para arroz no Genbank.

GENE	PRIMER	Nº DE BASES
Cutinase 5'	AAAGTCGACATGCCCCGACGCGGGCGGCCG	28
Cutinase 3'	AAAGTCGACTTATTGTGACTGCGCCTTTG	29
Calreticulina 5'	AAAGTCGACATGGGAAGTCGCAGCG	25
Calreticulina 3'	AAAGTCGACTCAAAGCTCATCATGGTAGTC	30
Aspartato amino transferase 5'	AAAGTCGACATGGCGTCGTCGTCG	25
Aspartato amino transferase 3'	AAAGTCGACTCACTTCAGTTTTGTGACTGCGGC	33
Sec 14 like protein 5'	AAAGTCGACATGGCGGGCAACAGAGG	26
Sec 14 like protein 3'	AAAGTCGACCTAATCAAGGTTAATTCGCGCG	31
Beta-keto acil redutase 5'	AAAGTCGACATGGCCGGCACGTGCGC	26
Beta-keto acil redutase 3'	AAAGTCGACTCACAGCGCCTTCTTCTTGGCG	31
ATP sintase subunit b 5'	AAAGTCGACATGGTGGAGACTAGTATCG	28
ATP sintase subunit b 3'	AAAGTCGACTTAGCTTGTGGAGTCGCGGCTG	31
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 5'	AAAGTCGACATGGCGGGCGGTGGCGGGGAC	29
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 3'	AAAGTCGACTCAGCCATGGTGTAGGATGGAG	32
ADP/ATP translocase 5'	AAAGTCGACATGGAAGCTGTGATTCAAACC	30
ADP/ATP translocase 3'	AAAGTCGACTTATAAGTTGGTGGGAGCAGATTTC	34
Transportador de fosfato mitocondrial 5'	AAAGTCGACATGGCGCTCTCCGACCGCTCCCCGC	33
Transportador de fosfato mitocondrial 3'	AAAGTCGACGCAGAGAAAGCATTGCAAGCCAG	32
<i>Oryza sativa</i> vacuolar ATPase beta subunit 5'	AAAGTCGACATGGGTCTGGTGAAGGATGGCGCC	33
<i>Oryza sativa</i> vacuolar ATPase beta subunit 3'	AAAGTCGACTCAGTGGGTAGCATCTCTGCTG	31

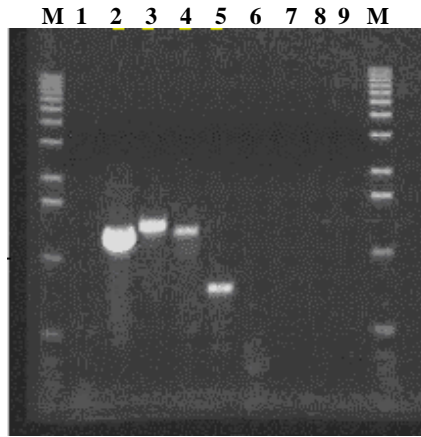


FIGURA 4: Gel de RT-PCR utilizando o segundo conjunto de pares de *primers* descritos na Tabela 14. M: marcador molecular 1kb; 1: cutinase; 2: ADP/ATP translocase; 3: calreticulina; 4: aspartato aminotransferase; 5: sec 14; 6: beta ketoacil redutase; 7: ATP sintase; 8: GAPDH e 9: ATPase vacuolar. Observou-se amplificação apenas em 2, 3, 4 e 5.

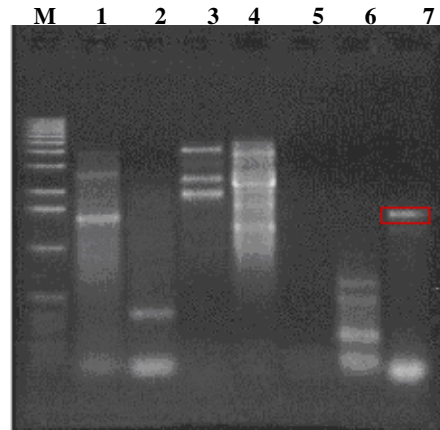


FIGURA 5: Gel de RT-PCR utilizando o segundo conjunto de pares de *primers* descritos na Tabela 14. MM: marcador molecular 1kb; 1: cutinase; 2: beta ketoacil redutase; 3: ATP sintase; 4: GAPDH; 5: ADP/ATP translocase; 6: transportador de fosfato mitocondrial e 7: ATPase vacuolar, estando esta última evidenciada devido à amplificação real.

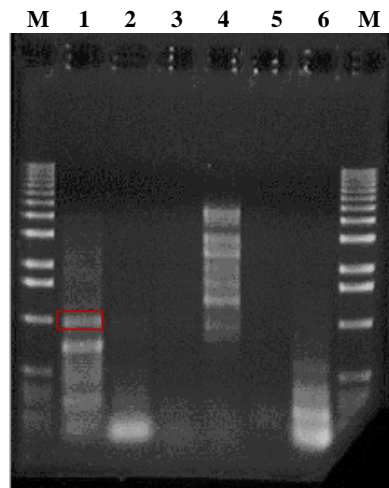


FIGURA 6: Gel de RT-PCR utilizando o segundo conjunto de pares de *primers* descritos na Tabela 14. M: marcador Molecular; 1: cutinase; 2: beta ketoacil redutase; 3: ATP sintase; 4: GAPDH; 5: ADP/ATP translocase e 6: transportador de fosfato mitocondrial. Observou-se amplificação da região esperada na amostra 1.

A partir de todos os ensaios de RT-PCR realizados, não foi possível obter as seqüências completas para os genes ATP sintase e beta ketoacil redutase (GL8).

Como resultado desses experimentos, foi possível montar os cassetes de transformação para três dos dez genes candidatos listados na Tabela 11: ADP/ATP translocase (de milho), GAPDH (de milho) e transportador de fosfato mitocondrial (de milho), todos eles relacionados a rotas metabólicas.

5 CONCLUSÕES

Com a técnica de hibridação subtrativa seguida de PCR (SSH) foi possível gerar uma biblioteca subtrativa de genes diferencialmente expressos sob o estresse de alumínio em três diferentes espécies de monocotiledôneas: arroz, milho e sorgo. Foram identificados e seqüenciados 48 cDNAs em plantas de arroz, 46 em milho e 81 em sorgo. As seqüências desses genes foram comparadas, por homologia, com as disponíveis no banco genômico BLAST.

Dez genes candidatos foram selecionados para a montagem de cassetes gênicos de transformação. Foram montados cassetes gênicos com três desses genes (ADP/ATP translocase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e transportador de fosfato mitocondrial). Esses cassetes serão introduzidos em plantas de milho, por meio da transformação genética via biobalística, com a finalidade de analisar o efeito da superexpressão desses genes em plantas mantidas sob diferentes formas de estresses abióticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN-BAUME, V.; SÉGUI, B.; COCKCROFT, S. Current thoughts on the phosphatidylinositol transfer protein family. **FEBS Letters**, v. 531, p. 74-80, 2002.

BAKER, A.; LEAVER, C. J. Isolation and sequence analysis of a cDNA encoding the ATP/ADP translocator of *Zea mays* L. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 16, p. 5857-5867, 1985.

BALAJI, J.; CROUCH, J. H.; PETITE, P. V.; HOISINGTON, D. A. A database of annotated tentative orthologs from crop abiotic stress transcript. **Bioinformatics**, v. 1, n. 16, p. 225-227, 2006.

BANKAITIS, V. A.; MALEHORN, D. E.; EMR, S. D.; GREENE, R. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, p. 1271-1281, 1989.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clue to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 48, p. 75-92, 2002.

BEATTIE, G. A.; MARCELL, L. M. Effect of alterations in cuticular wax biosynthesis on the physicochemical properties and topography of maize leaf surfaces. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 1-16, 2002.

BINNECK, E. As ômicas: integrando a bioinformação. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 32, p. 28-37, 2004.

CAI, Q.; GREENWAY, K. B.; STOREY, K. B. Differential regulation of the mitochondrial ADP/ATP translocase gene in wood frogs under freezing stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1353, p. 69-78, 1997.

CANÇADO, G. M. A.; PARENTONI, S. N.; BORÉM, A.; LOPES, M. A. Avaliação de nove linhagens de milho em cruzamentos dialélicos quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 471-478, 2002.

CRUZ-ORTEGA, R.; CUSHMAN, J. C.; OWNBY, J. D. cDNA clones encoding 1,3- β -glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. **Plant Physiology**, v. 114, p. 1453-1460, 1997.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v. 107, p. 315-321, 1995.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. C.; CAMPBELL, A. P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E. D.; SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6025-6030, 1996.

EMBRAPA CERRADOS: CONHECIMENTO, TECNOLOGIA E COMPROMISSO AMBIENTAL. **Documentos 4/Embrapa Cerrados**, p.1-43, Planaltina-DF, 2005.

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v. 122, p. 657-665, 2000

FRATIANNI, A.; PASTORE, D.; PALLOTTA, M. L.; CHIATANTE, D.; PASSARELLA, S. Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells. **Bioscience Reports**, v. 21, n. 1, p. 81-91, 2001.

GUO, P.; BAI, G.; CARVER, B.; LI, R.; BERNARDO, A.; BAUM, M. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 277, p. 1-12, 2007.

HAMILTON, C. A.; GOOD, A. G.; TAYLOR, G. J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminum in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant Physiology**, v. 125, p. 2068-2077, 2001.

HASHIMOTO, H.; NISHI, R.; UMEDA, M.; UCHIMIYA, H.; KATO, A. Isolation and characterization of a rice cDNA clone encoding ATP/ADP translocator. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 163-164, 1993.

JOUANNIC, N.; LEPETIT, M.; VERGNOLLE, C.; CANTREL, C.; GARDIES, A.; KADER, J.; ARONDEL, V. Isolation of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* that complements the *sec14* mutant of yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 258, p. 402-410, 1998.

KAPRANOV, P.; ROUTH, S. M.; BANKAITIS, V. A.; BRUIJN, F. J.; SZCZYGLOWSKI, K. Nodule-specific regulation of phosphatidylinositol transfer protein expression in *Lotus japonicus*. **The Plant Cell**, v. 13, p. 1369-1382, 2001.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, A. A. How do crop plants tolerance soils acids? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.

LÓPEZ-BUCIO, J.; JACOBO-NIETO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELA, L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v. 160, p. 1-13, 2000.

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

MANJUNATH, S.; SACHS, M. M. Molecular characterization and promoter analysis of the maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family and its expression during anoxia. **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 97-112, 1997.

MARIANO, E. D.; JORGE, R. A.; KELTJENS, W. G.; MENOSSI, M. Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminum stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 157-172, 2005.

MICHALAK, M.; CORBETT, E. F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochemistry Journal**, v. 344, p. 281-292, 1999.

MING, F.; MI, G. H.; LU, Q.; YIN, S.; ZHANG, S. S.; GUO, B.; SHEN, D. L. Cloning and characterization of cDNA for the *Oryza sativa* phosphate transporter. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 401-411, 2005.

MITSUKAWA, N.; OKUMURA, S.; SHIRANO, Y.; SATO, S.; KATO, T.; HARASHIMA, S.; SHIBATA, D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 7098-7102, 1997.

MONKS, D. E.; AGHORAM, K.; COURTNEY, P. D.; DeWALD, D. B.; DEWEY, R. E. Hyperosmotic stress induces the rapid phosphorylation of a soybean phosphatidylinositol transfer protein homolog through activation of the protein kinases SPK1 and SPK2. **The Plant Cell**, v. 13, p. 1205-1219, 2001.

NAVAZIO, L.; BALDAN, B.; MARIANI, P.; GERWIG, G. J.; Vliegenthart, J. F. G. Primary structure of the N-linked carbohydrate chains of calreticulin from spinach leaves. **Glycoconjugate Journal**, v. 13, p. 977-983, 1996.

OUYANG, B.; YANG, T.; LI, H.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; FEI, Z.; YE, Z. Identification of early salt stress response genes in tomato root by suppression subtractive hybridization and microarray analysis. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-14, 2007.

RICHARDS, K. D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y. K.; DAVIS, K. R.; GARDNER, R. C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 116, p. 409-418, 1998.

RUSSELL, D.; SACHS, M. M. Differential expression and sequence analysis of the maize glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene family. **The Plant Cell**, v. 1, p. 793-803, 1989.

SANDERS, D.; BROWNLEE, C.; HARPER, J. F. Communicating with calcium. **The Plant Cell**, v. 11, p. 691-706, 1999.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v. 37, p. 645-653, 2004.

SCHULTZ, C. J.; CORUZZI, G. M. The aspartate aminotransferase gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. **The Plant Journal**, v. 7(1), p. 61-75, 1995.

SIEBER, P.; SCHORDERET, M.; RYSER, U.; BUCHALA, A.; KOLATTUKUDY, P.; MÉTRAUX, J.P.; NAWRATH, C. Transgenic Arabidopsis plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. **The Plant Cell**, v. 12, p. 721-737, 2000.

SIVAGURU, M.; EZAKI, B.; HE, Z.; TONG, H.; OSAWA, H.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1-11, 2003.

SONG, J.; YAMAMOTO, K.; SHOMURA, A.; YANO, M.; MINOBE, Y.; SASAKI, T. Characterization and mapping of cDNA encoding aspartate aminotransferase in rice, *Oryza sativa* L. **DNA Research**, v. 3, p. 303-310, 1996.

TANG, H.; ZHENG, Y. L.; HE, L. Y.; LI, J. S. Isolation of maize genes related to aluminum tolerance. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 31, n. 5, p. 507-514, 2005.

VEDOY, C. G.; BENGTSON, M. H.; SOGAYAR, M. C. Hunting for differentially expressed genes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 877-884, 1999.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n.1, p. 129-143, 2005.

WYATT, S. E.; TSOU, P.; ROBERTSON, D. Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increases bioavailable calcium stress in plants. **Transgenic Research**, v. 11, p. 1-10, 2002.

WONG, Y.; HO, C.; NGUYEN, P. D.; TEO, S.; HARIKRISHNA, J. A.; RAHIM, R. A.; WONG, M. C. V. L. Isolation of salinity tolerant genes from the mangrove plant, *Bruguiera cylindrica* by using suppression subtractive hybridization (SSH) and bacterial functional screening. **Aquatic Botany**, v. 86, p. 117-122, 2007.

XIAO, K.; BAI, G.; CARVER, B. F. Nylon Filter arrays reveal differential expression of expressed sequence tags in wheat roots under aluminum stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, p. 839-848, 2005.

XU, X.; DIETRICH, C. R.; DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; WEN, T.; ROBERTSON, D. S.; NIKOLAU, B. J.; SCHNABLE, P. S. Sequence analysis of the cloned glossy8 gene of maize suggest that it may code for a β -ketoacyl reductase required for the biosynthesis of cuticular waxes. **Plant Physiology**, v. 115, p. 501-510, 1997.

YANG, Y.; KNOW, H.; PENG, H.; SHIH, M. Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 101, p. 209-216, 1993.

ZENG, H.; DENG, L.; ZHANG, C. Cloning of salt tolerance-related cDNAs from the mangrove plant *Sesuvium portulacastrum* L. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 48, n. 8, p. 952-957, 2006.

ZHANG, Z.; ZOU, X.; TANG, W.; ZHENG, Y. Revelation on early response and molecular mechanism of submergence tolerance in maize roots by microarray and suppression subtractive hybridization. *Environmental and Experimental Botany*, v. 58, p. 53-63, 2006.

**CAPÍTULO 2: GENETIC TRANSFORMATION OF TROPICAL MAIZE
GENOTYPES VIA BIOLISTICS**

ABSTRACT

Petrillo, Caroline Pereira. Genetic Transformation of Tropical Maize Genotypes via Biobalistic. In: _____. **Superexpressão do *ADP/ATP Translocase* em Milho Submetido aos Estresses Salino e de Alumínio.** 2007. C. 2, p. 48-63. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

A transformation system for tropical maize genotypes was developed by improving conditions for bombardment of immature embryos. Particle bombardment was carried out using a construct containing *bar* and *uidA* genes. The best conditions found to transform immature embryos from tropical inbred lines L3 and L1345 were an helium pressure of 1100 psi, 10 ng DNA / μg tungsten, two shots per plate and a microcarrier flying distance of 660mm. Transformation frequencies using this protocol ranged from 0.66% to 3% when immature embryos of tropical Lines L3 and L1345 were used as explants.

Key words: GUS, phosphinotricin acetyl transferase, immature embryo, transgenic

Abbreviations: BAP, 6-benzylaminopurine; NAA, 1-naphthalene acetic acid; DICAMBA, 3,6-dichloroanistic acid; MS, Murashige and Skoog; *bar* gene, phosphinothricin-N-acetyltransferase isolated from *S. Hygroscopicus*; *uidA*, β -glucuronidase

Guidance Committee: Dr. José Donizeti Alves, UFPA/ DBI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO

Petrillo, Caroline Pereira. Transformação Genética de Genótipos de Milho Tropical via Biobalística. In: _____. **Superexpressão do *ADP/ATP Translocase em Milho Submetido aos Estresses Salino e de Alumínio***. 2007. Cap. 2, p. 48-63. Dissertação (Mestre em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Um sistema de transformação para genótipos de milho tropical foi desenvolvido por meio do melhoramento das condições para o bombardeamento de embriões imaturos. Realizou-se o bombardeamento de partículas utilizando-se uma construção contendo os genes *bar* e *uidA*. As melhores condições encontradas para transformar embriões imaturos das linhagens tropicais L3 e L1345 foram a 1100 psi de pressão de hélio, 10 ng DNA/ μ g de tungstênio, dois tiros por placa e a distância de 660 mm do microcarreador. A frequência de transformação usando esse protocolo aumentou de 0,66% para 3%, quando os embriões imaturos das linhagens tropicais L3 e L1345 foram usados como explantes.

Palavras-chave: GUS, fosfinotricina acetiltransferase, embriões imaturos, transgênico.

Abreviações: BAP, 6-benzilaminopurina; ANA, ácido naftaleno acético; DICAMBA, ácido 3,6-dicloro-0-anísico; MS, Murashige and Skoog; gene *bar*, fosfinotricina-N-acetiltransferase isolado de *S. Hygroscopicus*; *uidA*, β -glucuronidase.

Comitê Orientador: Dr. José Donizeti Alves, UFLA/ DBI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

1 INTRODUCTION

The enormous progress achieved by molecular and cellular biology in recent years has generated a new understanding for many basic genetic concepts and biochemical mechanisms, allowing the appearance of improved strategies for breeding and cultivar development. Among the new generated technologies, plant cell transformation is an important tool for the genetic manipulation and improvement of crop species. As a major commodity in international agriculture and an important source of protein and energy for human and livestock nutrition, maize has been one of the prime targets for genetic manipulation. However, most studies on maize transformation have utilized genotypes adapted to temperate zones (Bohorova et al., 1999), therefore it is necessary to develop technologies for the production of transgenic tropical and subtropical maize lines.

To transfer foreign genes into the maize genome, various reports have shown that microprojectile bombardment has been a successful technique (Klein et al., 1989; Fromm et al., 1990; Gordon-Kamm et al., 1990; Register et al., 1994; Wan et al., 1995; Brettschneider et al., 1997; Frame et al., 2000). The biolistic concept, introduced by Klein et al. (1988a) employs high-velocity metal particles to deliver biologically active DNA into cells.

The immature embryo is a suitable primary explant from which fertile maize plants can be regenerated. Different tropical maize genotypes are able to form Type I as well as Type II callus from immature embryo cultures (Prioli and Silva 1989; Carvalho et al., 1997; Bohorova et al., 1999), and according to Brettschneider et al. (1997), both calli types are suitable target for biolistic transformation.

In this report, using a chimeric gene coding for the production of β -glucuronidase (GUS) and phosphinothricin acetyltransferase (PAT), some of the

important parameters necessary for DNA delivery into *Zea mays* cells, including helium accelerating pressure, microcarrier flying distance, number of shots per plate and, osmotic treatment of target tissue were analyzed. As a result a successful transformation protocol via biolistics for tropical maize genotypes was developed.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Explant Preparation

Immature embryos, between 1.0 - 2.0 mm in length (8-16 days after pollination), were harvested from plants produced at the National Maize and Sorghum Research Center / Embrapa Maize and Sorghum experimental fields. Seeds used in these experiments were from the L1345 and L3 tropical maize inbred line, with a high capacity for plant regeneration (Carvalho et al., 1997). Ears were surface-sterilized using half-strength liquid commercial bleach (1:1 / bleach : water) and 0,01% Tween 20, during 40 minutes and then rinsed three times with sterilized distilled water. Immature embryos were isolated and cultivated scutellum-side up onto the surface of BCI callus induction medium [N6 salts and N6 vitamins (Chu et al., 1975), 100 mg/L myo-inositol, 2.87 g/L proline, 200 mg/L hydrolyzed casein, 30 g/L sucrose, 2.5 g/L phytigel, 7.5 mg/L silver nitrate, 6.6 mg/L dicamba]. The pH was adjusted to 5.8 with 1 N potassium hydroxide prior autoclaving. Cultures were kept in Petri dishes (100 X 25 mm) at 27°C and dark for callus initiation and maintenance.

2.2 Selection and Plant Growth

Selection of putative transformed tissues began 14 days after bombardment when the explants were subcultured every two to three weeks on BSM media (BCI media lacking L-proline and casein) containing increasing concentrations (6 and 9 mg/L) of ammonium glufosinate (4-Hidroxi-methyl phosphynol-DL-Homoalanine ammonium salt 20% m/v), the active compound of the commercial herbicide Finale[®] (Bayer Crop-Science / São Paulo).

Regeneration was initiated by placing the transformed callus tissues for two weeks on RM medium [MS salts and vitamins (Murashige and Skoog,

1962), 60 g/L sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 0.2 mg/L NAA, 3 g/L phytigel, pH 5.8) supplemented with 6 mg/L ammonium glufosinate and cultured in the dark at 25°C for somatic embryo maturation. Mature somatic embryos showing an opaque coloration were transferred to Magenta boxes containing half strength MS media without plant growth regulators, supplemented with 3 mg/L ammonium glufosinate and placed in a lighted (16 hours) growth room. Germinated plantlets (4-6 cm) were cultured in soil, for the first week under a plastic lid, in a greenhouse.

2.3 Plasmid construct

The plasmid used in this study, pCAMBIA 3308 (Roberts et al., 1997), contains the CaMV35S promoter directing the synthesis of both *E. coli* β -glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1987), and phosphinothricin acetyltransferase (PAT). Plasmid DNA used in bombardment experiments was purified by a cesium chloride gradient as described by Sambrook et al. (1989).

2.4 DNA bombardment

Immature embryos, cultured during five days on BCI medium, were bombarded with tungsten microprojectiles using a biolistics particle helium acceleration device (Biomics – Brasília / Brazil). To precipitate DNA onto the microparticles 8 μ l plasmid DNA (stock 1 μ g/ μ l) were added to 50 μ l tungsten particle M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) stock solution (60 mg/ml) under low agitation. A 50% glycerol sterile solution was used to prepare the tungsten stock solution. Next, 50 μ l CaCl₂ (stock 2.5M) and 20 μ l spermidin (stock 0.1M) were added and homogenized. The mixture was kept for three minutes under low agitation and for an additional three minutes without agitation. Particles coated with DNA were centrifuged five seconds at 5 000 g,

rinsed carefully three times with 150 µl 100% ethanol and resuspended in 60 µl 100% ethanol. Six microliter aliquots were deposited at the center of sterile Kapton (Du Pont) discs (24 mm) used for explant bombardment.

Bombardments were performed on 60 x 15 mm Petri dish (Falcon 1007) containing 100 - 150 immature embryos, placed within a 35 mm diameter circle. A steel net (100 mesh) was placed 50 mm above the plate with the explants.

Prior to bombardment, explants were placed on BCI osmoticum medium (BCI media containing 12% sucrose) during four hours.

2.5 Histochemical GUS activity assay

For the transient expression studies, 10% of bombarded explants were incubated two days after bombardment at 37°C for 20 h in a solution containing 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D glucuronide (X-Gluc, Sigma Chem. Co.), 50 mM phosphate buffer pH 6.8, 20% methanol, 1% Triton X-100 (Rueb and Hensgens, 1998). GUS spots were scored using a stereomicroscope Stemi SV11 Zeiss (Germany). Tissue of stable transformed calli and plants were stained in the same way. After staining, chlorophyll was extracted from leaf tissue in 70% ethanol for 30-60 min.

2.6 Analysis of transgenic R0 plants

Total genomic DNA was isolated from leaf tissue of primary transformants using a CTAB protocol described by Saghai-Marroof et al. (1984). Aliquots of DNA (20 µg), digested overnight with *Hind* III restriction enzyme, were electrophoresed on a 0,8% agarose gel and transferred to a nylon membrane filter (Micron Separation Inc. MA). Foreign introduced DNA was detected using a CaMV35S promoter probe PCR-labeled with non-radioactive chemiluminescent digoxigenin (Boehringer Mannheim, Germany).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Maize tissue culture

The main goal of this work was to develop a reproducible transformation system for tropical maize genotypes. One of the basic requisites for the production of genetically transformed maize is the ability to efficiently regenerate plants. Among the factors that affect plant culture response is the genotypic variation (Hodges et al., 1986). A188 and HiII are temperate genotypes with the best regeneration response in tissue culture (Hodges et al., 1986), with regard to tropical lines, Carvalho et al. (1997) evaluated the performance of 113 maize inbreds in media supplemented with dicamba and AgNO_3 . In the present work we used immature embryos from tropical inbred lines, L1345 (Carvalho et al. 1997) and L3, because of their favorable agronomic characteristics. The majority of callus developed by these two lines, in culture media based on N6 salts, was from Type I, however the inbred line L3 was able to form Type II callus at frequency of 19% (Figure 1 B and C). N6 salts has been used by Armstrong and Green (1985) to produce a high frequency of Type II callus from the inbred line A188, though, the formation of Type II callus is more genotype dependent than the formation of Type I (Wang et al. 1995).

During the callus regeneration step we observed that a 2 to 3 weeks maturation period, when calli were subcultured in a medium with elevated sucrose (60 g/l) and phytigel (3 g/l) concentrations and low temperature (25°C), was essential for high percentage of plant regeneration. Throughout the maturation period somatic embryos lost its shiny aspect and became white and opaque (Figure 1D). The germination of the white and opaque mature somatic embryos (Figure 1E and F) happened in less than a week, while plant regeneration from calli that were not submitted to the maturation process usually took more than a month or, in most cases, did not occur.

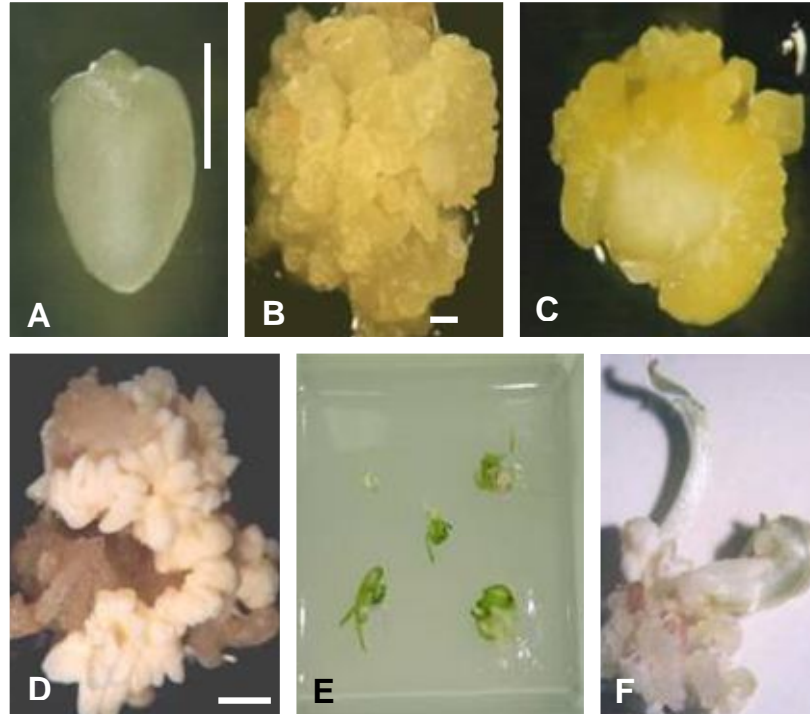


FIGURE 1: Different stages of tropical maize tissue culture. (A) immature somatic embryo; (B) type I embryogenic callus from tropical inbred line L3; (C) type I embryogenic callus from tropical inbred line L1345; (D) mature embryos from L1345 (white and opaque structures); (E and F) germination of callus from line L1345.

3.2 DNA delivery parameters and transgenic maize production

During biolistic experiments cell damage can occur as consequence of an uneven distribution of microprojectiles and/or an acoustic shock wave accompanying the helium blast (Hunold et al., 1994). To reduce tissue damage due to these factors, we intercalated a mesh screen between the particle accelerator and the plate with explants (Birch and Franks, 1991; Brettschneider et al., 1997).

Another delicate step in transformation via biolistics is the damage suffered by the target tissue during microparticle penetration into the cell. To minimize this type of problem the target cells are usually plasmolysed by an

osmotic treatment (Armaleo et al., 1990; Vain et al., 1993 and Brettschneider *et al.*, 1997). Osmotic pressure elevation is generally obtained by the addition of mannitol, sorbitol, maltose or sucrose to the culture medium (Armaleo et al., 1990; Vain et al., 1993; Brettschneider et al., 1997 and Bohorova et al., 1999). We increased the osmotic pressure by adding 12% sucrose to the pretreatment medium. A higher number of transient GUS signals were present when immature embryos were subcultured 4 hours before bombardment on callus induction medium with a higher osmolarity compared with embryos bombarded without osmotic pretreatment (Figure 2B). Vain et al. (1993) showed that there was a gain in transient expression when embryos were maintained for 16 more hours after bombardment in high osmotic concentration medium. Therefore, all the following bombardments were performed after incubation of explants for 4 hours in a medium containing 12% sucrose, and after bombardment explants were left in the same medium for 16 more hours.

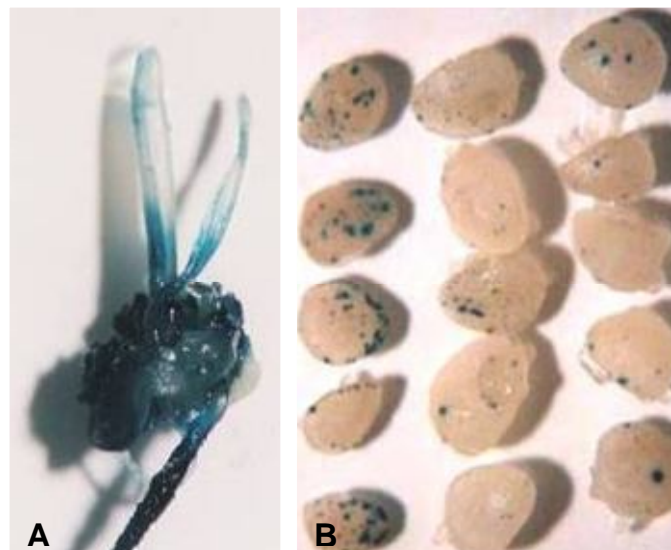


FIGURE 2: Expression of β -glucuronidase gene. (A) Callus and plantlet expressing the GUS reporter gene; (B) Transient GUS activity visualized in scutellar tissue of line L1345 under different osmotic pre-treatment conditions.

Acceleration pressure is another parameter that influences the ability to deliver DNA into various explants. The best results regarding cereal transformation have ranged from 650 psi (Frame et al., 2000) to 1,000 psi (Brettschneider et al., 1997; Bohorova et al., 1999). In our work, transient GUS expression was higher when immature embryos of tropical lines L1345 and L3 were bombarded at 1100 psi (Figure 3A). Stable transgenic plants were produced at a frequency of 0.66% and 1.24% when immature embryos of inbred line L1345 genotype were shot at 650 and 1100 psi, respectively. When the inbred line L3 was used, transgenic plants were generated, at a frequency of 1.7%, only when calli were bombarded at 1100 psi. A greater number of stable transgenic plants, from L1345 or L3 immature embryos, produced at 1100 psi helium acceleration pressure may be due to the presence of competent cells for embryogenesis in deeper cell layers as suggested by Brettschneider et al. (1997).

To increase the possibility of hitting a greater number of cells able to undergo somatic embryogenesis we tested the influence of more than one shot per plate on transient GUS expression and transformation rates. More than one consecutive shot on the same plate resulted in increased GUS transient expression (Figure 3B). Two shots per plate produced 1.31% and 0.9% of transgenic plants from inbred lines L3 and L1345, respectively, while there was no transgenic plants produced when three shots were used. Three shots per plate, probably caused more injury to the explants, which impair cell proliferation and regeneration. Kartha et al. (1989) and Reggiardo et al. (1991) found that more than one bombardment per plate had deleterious effects on barley and maize cells, respectively. However, in wheat, Wang et al. (1988) showed a direct relationship between an increase in the number of cells transiently expressing GUS and an increase in the number of shots per plates.

The distance from the microprojectile launch site to the biological target can affect the velocity of microprojectiles and consequently transformation rates.

Klein et al. (1988) tried to optimize the parameters for bombardment of maize cell cultures and reported that the shorter the microcarrier flying distance the higher the GUS transient expression obtained. However, according to Sanford et al. (1993) shorter microflight can have an undesirable effect upon particle dispersion and damage the explants due to strong gas shock. We detected higher number of expression units when explants were placed 660mm away from the launch platform, followed by 990 and 1320mm (Figure 3C). At 660mm, higher number of transgenic plants, 1.18% for line L1345 and 1.92% for line L3, were generated, which correlated with the transient expression results obtained. At 990 and 1320 mm no transgenics events were observed for these tropical genotypes.

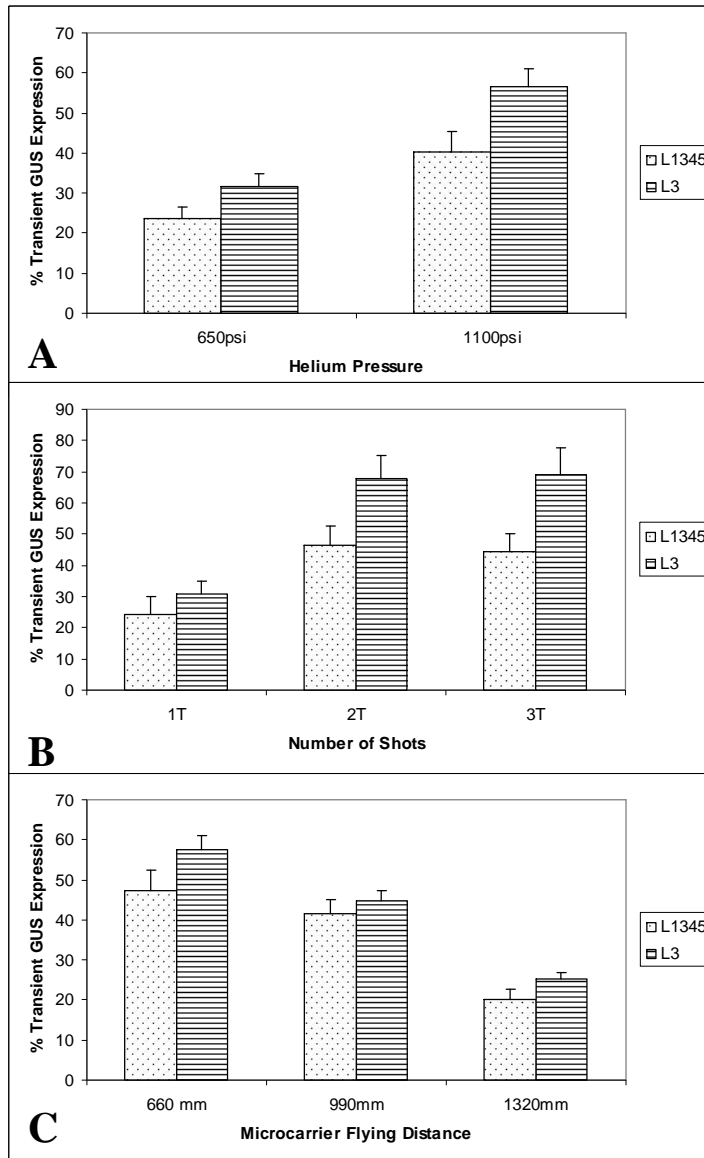


FIGURE 3: Transient expression of GUS on the surface of embryogenic calli from maize tropical inbred lines L1345 and L3 under different biolistic conditions. (A) helium acceleration pressure (Constant conditions: 10 ng DNA / μg tungsten particles and a microcarrier flying distance of 660 mm); (B) number of shots per plate (Constant conditions: 10 ng DNA / μg tungsten particles and a microcarrier flying distance of 660 mm); (C) Microcarrier flying distance (Constant condition: 10 ng DNA / μg tungsten particles). *Vertical bars* represent the SE of at least 10 determinations.

3.3 Selection, regeneration and growth of transgenic plants

The selection of transformed callus lines was done by subculturing bombarded explants in increasing concentrations of the herbicide Finale[®] (ammonium glufosinate 20% m/v) (Bayer Crop-Science / São Paulo). Fourteen days after bombardment, calli were transferred BSM media containing 3mg/L ammonium glufosinate lacking proline and hydrolyzed casein. It has been shown by Dennehey et al. (1994) that proline significantly interferes with glufosinate selection, a fact also observed in our experiments. After 2 weeks in medium with 3mg/L ammonium glufosinate, both the control and bombarded explants were still growing. Visible growth inhibition was observed when explants were transferred to media with 6mg/L ammonium glufosinate. Substantial cell death and growth inhibition occurred in both bombarded and non-bombarded calli when explants were subcultured for 2 more weeks in media supplemented with 9mg/L ammonium glufosinate. Embryogenic calli that developed in the selection medium were transferred onto regeneration medium with 6mg/L ammonium glufosinate for embryo maturation. Mature embryos lost their shiny and translucent appearance and became opaque within 3 to 4 weeks. These opaque structures were transferred to a half-strength MS medium supplemented with 3mg/L ammonium glufosinate and germination happened within 3 to 4 days. Putative transformed maize plants were transferred to potted soil and grown under greenhouse conditions.

3.4 Transgene integration and expression analysis of R0 transgenic plants

Three weeks after being transplanted to greenhouse, putative transgenic events were sprayed with 1mg/mL glufosinate Finale[®] (ammonium glufosinate 20% m/v) (Bayer Crop-Science / São Paulo), to test the expression of the introduced *bar* gene.

In plants that survived the selection procedure, integration of the transgene cassette into the genome was verified by Southern blot analysis (Figure 4). Glufosinate resistant plants contained from 1 to 10 copies of the CaMV35S promoter directing the synthesis of β -glucuronidase and PAT enzyme cassettes. Co-expression of the linked genes (*bar* and *uidA*) was detected in 21 out of the 67 plants analyzed. Most of the transgenic R0 plants had normal tassels and shed normal amounts of fertile pollen.

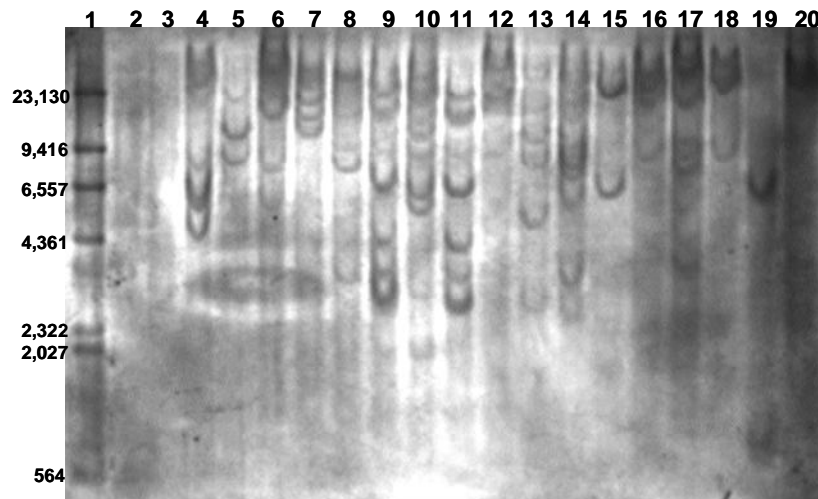


FIGURE 4: DNA blot analysis of pCAMBIA 3308 R0 plants. *Hind* III digested DNA was electrophoresed on 0.8% agarose, transferred to a nylon membrane and hybridized with non-radioactive digoxigenin labelled CaMV35S promoter probe. Lane 1 – λ DNA / *Hind*III; lanes 2 and 3 – Untransformed maize plants; lanes 4 to 20 – Transformed maize plants with different transgene copie numbers.

4 REFERENCES

Armaleo D, Ye GN, Klein TM, Shark KB, Sanford JC, Johnston SA (1990) Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Curr Gen** 17:97-103

Birch RG, Franch T (1991) Development and optimisation of microprojectile systems for plant genetic transformation. **Aust J Plant Physiol** 18:453-469

Bohorova N, Zhang W, Julstrum P, McLean S, Luna B, Brito RM, Diaz L, Ramos, ME, Estanol P, Pacheco M, Salgado M, Hoisington D (1999) Production of transgenic tropical maize with *cryIAb* and *cryIIAc* genes via microprojectile bombardment of immature embryos. **Theor Appl Genet** 99:437-444

Brettschneider R, Becker D, Lörz H (1997) Efficient transformation of scutellar tissue of immature embryos. **Theor Appl Genet** 94:737-748

Carvalho CHS, Bohorova NE, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997) Type-II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Rep** 17:73-76

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Bi CV (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen source. **Sci Sin** 18:659-668

Dennehey BK, Petersen WL, Ford-Santino C, Pajeau M, Armstrong CL (1994) Comparison of selective agents for use with selectable marker gene *bar* in maize transformation. **Plant Cell Tissue Organ Cult** 36:1-7

Frame BR, Zhang H, Cocciolone SM, Sidorenko LV, Dietrich CR, Pegg SE, Zhen S, Schnable PS, Wang K (2000) Production of transgenic maize from bombarded type II callus: Effect of gold particle and callus morphology on transformation efficiency. *In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant* 36:21-29

Fromm ME, Morrish F, Armstrong A, Williams R, Thomas J, Klein TM (1990) Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology** 8:833-839

Gordon-Kamm WJ, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brian JV, Chambers SA, Adams JWR, Willets NG, Rice TB, Mackey

CJ, Krueger W, Kausch AP, Lemaux PG (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **Plant Cell** 2:603-618

Hodges TK, Kamo KK, Imbrie CW, Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. **Bio/Technology** 4:123-133

Hunold R, Bronner R, Hahne G (1994) Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. **Plant J** 5(4):593-604

Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. **Plant Mol Biol Rep** 5:387-405

Kartha KK, Chibbar RN, Georges F, Leung N, Caswell K, Kendall E, Qureshi J (1989) Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. **Plant Cell Rep** 8: 429-432

Klein TM, Kornstein L, Sanford JC, Fromm ME (1989) Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. **Plant Physiol** 91:440-444

Klein TM, Fromm ME, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Slettern M, and Sanford JC (1988a). Transfer of foreign genes into intact maize cells using high velocity microprojectiles. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 85:4305-4309

Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC (1988b) Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. **Bio/Technology** 6:559-563

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

Prioli LM, Silva WJ (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. **Rev Bras Genet** 12:553-566

Reggiardo MI, Arana JL, Orsaria LM, Permingeat HR, Spitteler MA, Vallejos RH (1991) Transient transformation of maize tissues by microparticle bombardment. **Plant Science** 75:237-243

Register JC, Peterson DJ, Bell PJ, Bullock WP, Evans IJ, Frame B, Greenland AJ, Higgs NS, Jepson I, Jiao S, Lewnau CJ, Sillick JM, Wilson M (1994) Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. **Plant Mol Biol** 25:951-961

Roberts CS, Rajagopal CS, Nugroho S, Smith L, Nguyen T, Ravi KS, Dransfiels L, Harcourt R, Vijayachandra K, Patell V, Salaud C, Desamero N, Slamet I, Keese P, Kilian A, Jefferson RA (1997) A comprehensive new set of modular vectors to allow both routine and advanced manipulations and efficient transformation of rice by both *Agrobacterium* and direct gene-transfer methods. Rockefeller Foundation Meeting of the International Program on Rice Biotechnology.

Rueb S, Hensgens LAM (1998) Improved histochemical staining for β -glucuronidase activity in monocotyledonous plants. **Rice Genet. Newsl.** 6:168-169

Saghai-Marooif MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:8014-8018

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor, NY:** Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanford JC, Smith FD, Russel JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. **Methods Enzymol** 217:483-509

Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. **Plant Cell Rep** 12:84-88

Wan Y, Widholm JM, Lemaux PG (1995) Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). **Planta** 196:7-14

Wang YC, Klein TM, Fromm M, Cao J, Sanford JC, Wu R (1988) Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. **Plant Mol Biol** 11: 433-439

**CAPÍTULO 3: SUPEREXPRESSION DO *ADP/ATP TRANSLOCASE* EM
MILHO SUBMETIDO AOS ESTRESSES SALINO E DE ALUMÍNIO**

RESUMO

Petrillo, Caroline Pereira. **Superexpressão do *ADP/ATP Translocase* em Milho Submetido aos Estresses Salino e de Alumínio**. 2007. Cap. 3, p. 64 - 104. Dissertação (Mestre em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O Cerrado brasileiro ocupa uma área com cerca de 207 milhões de hectares, distribuídos em 12 estados. Nessa região, os solos são ácidos, com pouca matéria orgânica e altos teores de alumínio. Sob a forma de íons livres, o alumínio se torna tóxico para as plantas e afeta o crescimento e o desenvolvimento das mesmas. O milho, considerado uma importante cultura dessas regiões, sofre diversas injúrias causadas pela toxidez do Al presente nessas áreas. Nesse estudo, plantas de milho da linhagem L3 foram transformadas geneticamente com o gene *ADP/ATP translocase*, previamente isolado em ápice de raízes de milho sob estresse de Al, objetivando a produção de genótipos mais tolerantes a estresses abióticos. Análises fisiológicas dessas plantas, sob estresse de Al e estresse salino, sugerem que esse gene não confere tolerância ao Al, mas pode estar relacionado com tolerância à salinidade. Pressupõe-se que a superexpressão do gene *ADP/ATP translocase* controle os níveis de ATP celular, mantendo o equilíbrio energético durante o estresse.

Palavras-chave: cerrado, alumínio, milho, *ADP/ATP translocase*, transformação genética, estresses abióticos.

Comitê Orientador: Dr. José Donizeti Alves, UFLA/ DBI (orientador); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

Petrillo, Caroline Pereira. **Superexpression of the *ADP/ATP Translocase* in Maize Under Saline and Aluminum Stresses**. 2007. C. 3, p. 64-104. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The Brazilian Cerrado occupies an area with about 207 million hectares, distributed in 12 states. In this region, the soils are acid, with little organic substance and high aluminum levels. Under the form of free ions, the aluminum becomes toxic for the plants and affects their growth and development. Maize, considered an important culture in these areas, suffers several injuries caused by the toxicity of the present Al in these areas. In this study, plants of maize of the L3 line were genetically changed with the ADP/ATP translocase gene, previously isolated in apex of maize roots under Al stress with the objective of production of genotypes more tolerant to abiotic stresses. Physiological analyses of these plants, under Al stress and salinity stress, suggest that this gene does not have tolerance to Al, but can relate to salinity tolerance. It is estimated that the superexpression of the ADP/ATP translocase gene controls the levels of cellular ATP, keeping the energy balance during the stress.

Key-words: Cerrado, aluminum, maize, ADP/ATP translocase, genetic transformation, abiotic stresses.

Guidance Committee: Dr. José Donizeti Alves, UFLA/ DBI (advisor); Dra. Andréa Almeida Carneiro (co-advisor), Embrapa Milho e Sorgo.

1 INTRODUÇÃO

O Cerrado ocupa, no Brasil, 24% do território, com cerca de 207 milhões de hectares distribuídos em 12 estados. Sua área nuclear ocupa todo o Brasil Central, incluindo os estados de Goiás, Tocantins e Mato Grosso do Sul, a região sul de Mato Grosso, o oeste da Bahia, o oeste e o norte de Minas Gerais e o Distrito Federal.

Os solos ácidos do Cerrado possuem pouca matéria orgânica e altos teores de alumínio, que se encontra sob a forma de íons livres que intoxicam raízes de plantas, provavelmente por formar células rígidas e incapazes de se alongarem (Moffat, 1999).

O cerrado brasileiro possui, atualmente, enorme destaque no cenário agrícola nacional e mundial, sendo responsável por 46% da safra brasileira de soja, milho, arroz e feijão (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa, 2004). Quatorze milhões de hectares são cultivados com culturas anuais, como soja, algodão, milho; outros 3,5 milhões estão ocupados com culturas perenes, como café e frutas; e 60 milhões abrigam pastagens cultivadas.

A calagem é uma técnica bastante utilizada para a correção da acidez do solo, por meio do calcário. De acordo com Pitta et al. (2002), a calagem não é um procedimento simples, sendo necessário o conhecimento das características da propriedade agrícola, caracterização da área e da cultura, tipo de solo e conhecimento tecnológico.

Programas de melhoramento genético, visando à produção de plantas mais adaptadas às condições ambientais adversas, são implantados por diversos melhoristas. O melhoramento clássico, utilizado por muitos anos, envolve cruzamentos entre genótipos e seleção de plantas com fenótipo desejável. No entanto, é um processo lento, sendo necessários vários anos para produzir e liberar comercialmente uma nova variedade.

Atualmente, a engenharia genética propõe novas tecnologias para o desenvolvimento de plantas mais adaptadas às condições de estresses abióticos, sendo a transformação genética considerada uma nova alternativa para o melhoramento vegetal. A utilização dessas novas tecnologias pode causar um grande impacto econômico no desenvolvimento do agronegócio da região dos cerrados brasileiros.

Genes de resistência ao alumínio têm sido clonados de algumas plantas (Kochian et al., 2004). A identificação de genes induzidos pelo alumínio sugere que a superexpressão em genótipos sensíveis, por transformação genética, possibilite a obtenção de plantas mais tolerantes ao estresse causado por esse mineral.

No presente estudo, plantas de milho foram transformadas geneticamente com o gene ADP/ATP translocase (de milho), previamente identificado pela técnica de hibridação subtrativa seguida de PCR supressivo. A presença desse gene foi detectada no ápice das raízes de linhagens de milho, sorgo e arroz tolerantes ao Al tóxico, e que possuem diferentes mecanismos fisiológicos de tolerância a este tipo de estresse.

Trabalhos anteriores demonstraram a relação do gene ADP/ATP translocase com outros tipos de estresse, como o salino e baixas temperaturas (Hashimoto et al., 1993). No presente estudo, além dos testes com alumínio, as plantas transgênicas superexpressando o gene ADP/ATP translocase também foram submetidas ao estresse salino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do milho

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. Essa cultura ocupou, em 2006, uma área em torno de 12,9 milhões de hectares, responsável por uma produção de cerca de 42 milhões de toneladas de grãos. Estima-se que, para 2007, a produção seja de 52 milhões (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE, 2007).

O milho é o segundo cereal de maior importância econômica e social no Brasil, ficando atrás apenas da soja (Vilarinho, 2005). Devido às suas qualidades nutricionais, o milho é bastante utilizado na alimentação humana e animal.

2.2 Características do Cerrado brasileiro

O Cerrado representa uma grande área cultivável no país, respondendo por 31% da produção nacional de milho, 55% de soja, 18% de arroz e 22% de feijão (Embrapa Cerrados, 2005). Os solos do Cerrado caracterizam-se pela alta acidez, deficiência de cálcio e magnésio e presença de alumínio em níveis tóxicos para as plantas. O milho é uma cultura que sofre com esse tipo de estresse, o que leva à diminuição de sua produtividade nessas áreas.

2.3 Alumínio

O alumínio é o metal mais abundante da crosta terrestre, ocupando cerca de 7% da massa total (Delhaize & Ryan, 1995). Em solos com pH abaixo de 5.5, o alumínio se torna tóxico para as plantas (Kochian, 1995). A toxicidade desse mineral é um problema global que afeta a produtividade de várias culturas em solos ácidos (Lopes-Bucio et al., 2000).

A inibição do crescimento da raiz é o primeiro sintoma da toxicidade do alumínio em plantas, resultando em redução e em dano do sistema radicular, limitando a absorção de água e de nutrientes minerais, principalmente de fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Drummond et al., 2001; Kochian et al., 2004). O ápice da raiz (coifa, meristema e zona de alongamento) é o alvo para a toxicidade do alumínio. Essa região acumula mais alumínio e sofre mais danos fisiológicos do que os tecidos maduros de raízes (Delhaize & Ryan, 1995). Segundo Vitorello et al. (2005), o baixo pH afeta a estrutura da membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade, deixando a raiz das plantas mais sensível à aquisição de alumínio.

Estudos mostram que o grau de toxicidade do alumínio varia entre espécies de plantas, condições de crescimento, concentração do Al e tempo de exposição (Kochian et al., 2005). Dentre as injúrias que pode causar incluem-se alteração da troca entre cátions na parede celular, alterações estruturais na membrana plasmática afetando a assimilação de Ca^{2+} e Mg^{2+} , indução do estresse oxidativo, ligação do Al ao DNA ou RNA afetando a divisão celular e mudanças estruturais da parede celular das raízes (Drummond et al., 2001).

Espécies de plantas adaptadas aos solos ácidos possuem mecanismos de tolerância para se detoxificarem do alumínio. De acordo com Ishikawa & Wagatsuma (1998), espécies tolerantes acumulam menos Al no ápice da raiz que espécies sensíveis. Isso ocorre devido a vários mecanismos de resistência, como, por exemplo, os de exclusão (apoplástico) e os internos (simplásticos). A exclusão previne a entrada do alumínio através da membrana plasmática e os mecanismos internos imobilizam, compartimentalizam ou detoxificam esse metal quando entra nas células (Kochian, 1995; Taylor, 1995). A detoxificação do Al pela exsudação de ácidos orgânicos, tais como o malato e o citrato, é uma forma de exclusão. Plantas tolerantes ao Al usam ácidos orgânicos para se

desintoxicarem do Al^{3+} , tanto internamente como na rizosfera (Echart & Cavalli-Molina, 2001). Os ácidos orgânicos quelam e eliminam o alumínio fitotóxico.

Estudos genéticos sobre a tolerância ao alumínio mostram que existem vários genes envolvidos com respostas ao estresse. O primeiro gene clonado foi o ALMT1 (transportador de malato induzido pelo alumínio), em trigo. Esse gene codifica para uma proteína de membrana responsável pelo fluxo de malato e tolerância ao Al (Sasaki et al., 2004). Delhaize et al. (2004) geraram plantas transgênicas de cevada que expressavam o gene ALMT1. Esse gene conferiu tolerância a essas plantas quando foram expostas a soluções nutritivas contendo altas concentrações de alumínio.

Apesar de existirem vários estudos sobre o alumínio, os mecanismos responsáveis pela toxicidade e resistência ainda são pouco conhecidos (Kochian et al., 2004).

2.4 Salinidade

A salinidade do solo é um grave problema que atinge regiões semi-áridas do mundo, afetando o crescimento e o desenvolvimento de plantas e reduzindo a produtividade agrícola. Altas concentrações de sal diminuem o potencial osmótico do solo, ocasionando déficit hídrico nas plantas (Sairam & Tyagi, 2004). De acordo com a FAO (2000), os solos salinos ocupam 397 milhões de hectares da área global. Países da África, Europa, Ásia e América Latina possuem regiões afetadas pela salinidade.

No Brasil, os solos salinos são encontrados em regiões áridas e semi-áridas devido à baixa precipitação pluvial e à alta taxa de evaporação. No nordeste brasileiro é onde se encontra a maior parte das regiões semi-áridas do Brasil. Mais de três milhões de toneladas de milho são produzidos anualmente nessas regiões (Embrapa, 2002).

As técnicas de irrigação e drenagem são bastante utilizadas em áreas áridas e semi-áridas, no entanto, o manejo inadequado dessas técnicas pode acarretar na salinização dos solos. A água usada para irrigação possui alto teor de sais, contribuindo para o acréscimo da concentração salina no solo (Barros et al., 2005). Em extensas áreas do nordeste brasileiro, os solos sofrem salinização devido à irrigação.

Dentre os efeitos da salinidade sobre as plantas incluem-se a seca fisiológica, provocada pela redução do potencial osmótico, o desequilíbrio nutricional, devido à elevada concentração iônica e a inibição da absorção de outros cátions pelo sódio (Niu et al., 1995). A redução ou a inibição do crescimento das plantas ocorrem devido ao efeito osmótico, havendo redução da pressão de turgor associado à toxidez por altas concentrações de Na e Cl e ao desequilíbrio nutricional (Zhu et al., 2005). O desequilíbrio na transpiração das plantas, devido às altas concentrações salinas, resulta na acumulação de íons em níveis tóxicos na parte aérea, afetando o crescimento e o desenvolvimento das folhas (Hasegawa et al., 2000).

A salinização provoca um aumento nas concentrações de Cl^- e Na^+ no citosol, afetando o transporte intracelular de Ca^+ e K^+ , em algumas espécies de plantas (Cramer et al., 1987). Em plantas, os antiportes Na^+/H^+ , que se localizam nas membranas plasmática e vacuolar, são responsáveis pela remoção do Na^+ do citosol e a compartimentalização do mesmo nos vacúolos, para a manutenção da baixa concentração de Na^+ . Esses antiportes são ativados para reduzir a toxicidade do sódio, em plantas tolerantes, sob ambientes salinos. Segundo Blumwald (2000), o antiporte vacuolar possui um importante papel na tolerância ao sal.

Ohta et al. (2002) introduziram o gene antiporte Na^+/H^+ (AgNHX1), da planta halófito *Atriplex gmelini*, em plantas de arroz sensíveis ao sal. Nas plantas transgênicas de arroz, a atividade do antiporte vacuolar Na^+/H^+ foi oito vezes

maior do que em plantas selvagens de arroz. As plantas transgênicas que superexpressaram o gene AgNHX1 sobreviveram por três dias sob altas concentrações salinas, nas quais as plantas selvagens não sobreviveram. Esses resultados indicam que a superexpressão do gene AgNHX1 em plantas de arroz aumentou sua tolerância à salinidade.

A tolerância à desidratação ou a sua prevenção por meio da osmoregulação são consideradas mecanismos de tolerância à salinidade, o que permite a sobrevivência da célula quando ocorre diminuição do turgor (Neocleous & Vasilakakis, 2007). As plantas halófitas são adaptadas às condições salinas por apresentarem vários mecanismos de tolerância, como a compartimentalização de íons nos vacúolos, síntese de osmólitos compatíveis, adaptação osmótica, suculência, transporte e assimilação seletiva de íons, respostas enzimáticas, excreção de sal e controle genético (Borsani et al., 2003).

A obtenção de cultivares tolerante é possível por meio do melhoramento genético clássico ou da engenharia genética, com a obtenção de plantas transgênicas tolerantes. Várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de identificar genes que podem aumentar a resistência à salinidade dos solos em plantas. Os genes relacionados a mecanismos de tolerância podem ser classificados em cinco grupos, de acordo com suas funções, segundo Borsani et al. (2003). São eles: 1) síntese de osmólitos, com acumulação de osmólitos compatíveis, tais como prolina, glicina e álcoois, como respostas ao estresse osmótico; 2) proteção da integridade celular, com produção das peroxidases da parede celular; 3) estresse oxidativo, com síntese de oxidases para detoxificação das espécies reativas de oxigênio geradas pelo estresse; 4) homeostase iônica, com manutenção de concentrações de K^+ e diminuição intracelular de Na^+ ; 5) fatores de transcrição, sendo que a superexpressão desses fatores induz a expressão de genes que conferem tolerância à salinidade.

2.5 Gene ADP/ATP translocase

A família gênica do ADP/ATP translocase, ou transportadores de adenina nucleotídeo (ANT), faz parte de um sistema de transporte de ADP e ATP dentro de células eucarióticas, mediando a transferência da energia gerada pela fosforilação oxidativa pela energia consumida no citosol (Hashimoto et al., 1993) (Figura 1).

No genoma nuclear de eucariotos, tais como fungos, plantas e animais, têm sido identificados os genes que codificam transportadores de ADP/ATP. Em plantas, existe um sistema transportador na membrana dos plastídios, em que o ATP é importado do citosol e um outro sistema na membrana das mitocôndrias, nas quais o ATP é exportado para o citosol (Kurland & Andersson, 2000).

Em milho, seqüências de clones de cDNAs do ADP/ATP translocase foram isoladas por Baker & Leaver (1985), Bathgate et al. (1989) e Winning et al. (1991).

Alguns autores seqüenciaram o gene ADP/ATP translocase em diferentes espécies de eucariotos e compararam com seqüências de milho. Iacobazzi & Palmieri (1995) mostraram que seqüências de cDNA do ADP/ATP translocase de trigo possuem 90,3% de similaridade com milho. Cai et al. (1997) identificaram similaridade de 52% entre seqüências do ADP/ATP translocase de rãs tolerantes ao frio e de milho.

De acordo com Laloï (1999), genes que codificam ANT são expressos em todos os tecidos vegetais e são regulados por estresses externos. Vários autores estudaram a relação do gene ADP/ATP translocase com estresses abiótico, tais como alumínio (Sugimoto et al., 2004) e salino (Hashimoto et al., 1993), hídrico (Fратиanni et al., 2001) e de temperatura (Hashimoto et al., 1993; Cai et al., 1997).

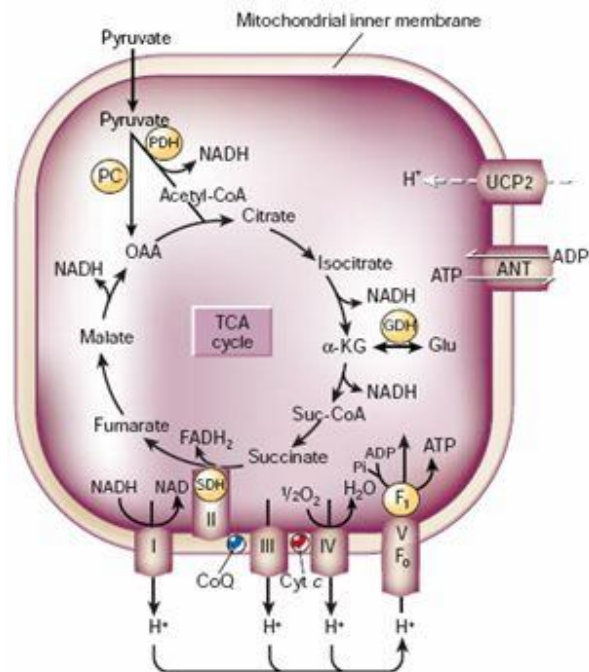


FIGURA 1: Esquema representativo de mitocôndria mostrando o transportador mitocondrial ADP/ATP translocase (ANT – transportador de adenina nucleotídeo). Fonte: Maechler & Wollhein (2001).

2.6 Transformação genética de milho via biobalística

Diversos sistemas de transferência de genes têm sido usados para a transformação de milho, tais como a biobalística, a eletroporação e a infecção por *Agrobacterium tumefaciens* (Wang et al., 2003; Frame et al., 2006). Dentre esses métodos, a biobalística tem sido usada em numerosos trabalhos para transformação de plantas monocotiledôneas.

A biobalística, ou bombardeamento de partículas, foi inicialmente proposta por Klein et al. (1987), visando à introdução do material genético no genoma de plantas superiores. Para introduzir o DNA dentro das células, essa técnica utiliza micropartículas de ouro ou tungstênio, impulsionadas, em alta

velocidade, através de um canhão gênico ou “gene gun”. Em milho, embriões ou calos embriogênicos são os explantes mais usados para o bombardeamento.

Um dos primeiros trabalhos com transformação de milho via biobalística foi feito por Gordon-Kamm et al. (1990), em que uma suspensão de células embriogênicas foi usada como explante. Como resultados, os autores obtiveram plantas férteis de milho transformadas.

Atualmente, o método descrito por Carneiro et al. (2004), para a produção de plantas transgênicas de milho via biobalística, é utilizado na Embrapa Milho e Sorgo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Transformação genética de milho via biobalística

3.1.1 Preparação do explante na cultura de tecidos

Espigas de milho tropical da linhagem L3, cultivado nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo, com aproximadamente 15 dias de polinização, foram coletadas e colocadas numa solução de 50% de água sanitária comercial e algumas gotas de detergente de uso doméstico, por 40 minutos, para esterilização. Em seguida, foram lavadas, por três vezes, com água destilada estéril.

Embriões imaturos, entre 1,0 e 1,5 mm de comprimento, foram extraídos das espigas e cultivados em meio de cultura BCI (N6 sais 4 g/L, N6 vitaminas, prolina 2,9 g/L, myo-inositol 100 mg/L, casaminoácidos 100 mg/L, sacarose 30 g/L, dicamba 6,6 mg/L, phitigel 2,5 g/L), para indução de calos, de acordo com Chu et al. (1975). O pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Calos embriogênicos, formados após 14 dias de subcultivo, foram usados como explantes.

3.1.2 Construção gênica

O cassete gênico utilizado é composto pelo promotor da ubiquitina, direcionando a síntese do gene ADP/ATP translocase e pelo terminador NOS (Figura 2).

Inicialmente, o terminador NOS foi amplificado por PCR do vetor pCAMBIA 3301 (Cambia, Canberra, Austrália), utilizando *primers* específicos. O fragmento foi ligado no vetor TOPO-TA (Invitrogen, USA) e o plasmídeo foi amplificado em *E. coli*, clivado com *EcoRI* e clonado no vetor pCAMBIA 3301, clivado com a mesma enzima. O segundo passo foi o isolamento do promotor da ubiquitina do vetor pAHC17, utilizando as enzimas *HindIII/BamHI*. O

fragmento correspondente ao promotor foi isolado do gel utilizando-se o kit Qiagen (USA) e ligado no vetor pCAMBIA 3301 (já contendo o terminador NOS), clivado com as mesmas enzimas cujo mapa se encontra na Figura 2. O gene ADP/ATP translocase foi isolado pela reação da transcriptase reversa (RT-PCR) utilizando-se os *primers* específicos (Tabela 1).

A enzima transcriptase reversa utilizada foi a SuperscriptIII (Invitrogen) e a enzima utilizada para o PCR foi a AdvantageTaqPol (Clontech, USA). As condições de amplificação foram de 30 ciclos, a 95°C, por 15 segundos; 60°C, por 30 segundos e 72°C, por 3 minutos. O produto dessa reação foi visualizado em gel de agarose. A banda correspondente ao tamanho correto do amplicon desejado foi eletroeluída do gel e clonada no vetor TOPO-TA. Após a confirmação de que a banda clonada tinha a seqüência correta, por sequenciamento, o gene ADP/ATP translocase foi clivado do TOPO-TA com *Bam*HI e ligado no vetor pCAMBIA 3301 (já contendo o promotor da ubiquitina e o terminador NOS), cortado com a mesma enzima.

As reações de clivagem e ligação foram realizadas conforme instruções do fabricante (Invitrogen, USA). Para as reações de sequenciamento para confirmação da construção gênica, utilizaram-se *primers* correspondendo a diferentes regiões do promotor ubiquitina, do gene ADP/ATP translocase e das regiões flangeadoras do "polylinker" do plasmídeo pCambia 3301 (M13F e M13R). Essas reações foram realizadas no ABI Prism 3100 DNA Analyzer, utilizando-se o kit "Big Dye Terminator" v. 3.01 (Applied Biosystems, Foster City, CA). As seqüências obtidas foram montadas utilizando-se o programa CAP3 (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>), obtendo-se uma seqüência consenso para cada clone.

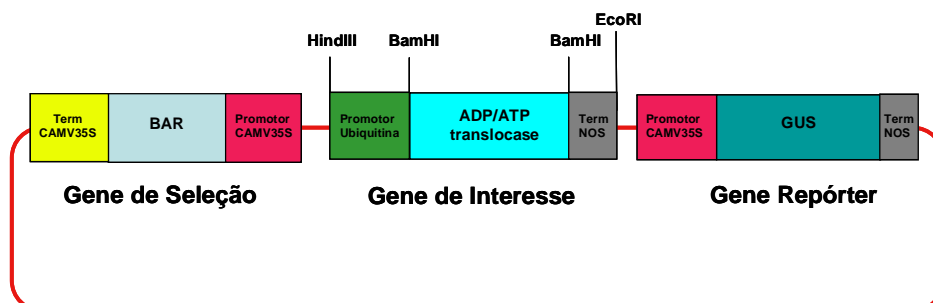


FIGURA 2: Cassete gênico de transformação contendo as construções UBI::ADP/ATP translocase::NOS, 35S::BAR::NOS e 35S::GUS::NOS. NOS: terminador; CaMV35S: promotor constitutivo viral; *bar*: gene que confere resistência a fosfotricina; GUS: gene repórter.

TABELA 1: Sequência dos *primers* específicos do gene ADP/ATP translocase de milho.

GENE	PRIMER	No DE BASES
ADP/ATP translocase Milho 5'	AAA GGA TCC ATG CAG ACC CCG CTC TGT G	28
ADP/ATP translocase Milho 3'	AAA GGA TCC AGG ATA GTT ACG AGT GTT TGG AG	32

3.1.3 Biobalística

Calos embriogênicos, usados como explantes, foram bombardeados com micropartículas de tungstênio utilizando-se o Gene Gun (Figura 3a e 3b). O protocolo utilizado foi de acordo com Carneiro et al. (2004).

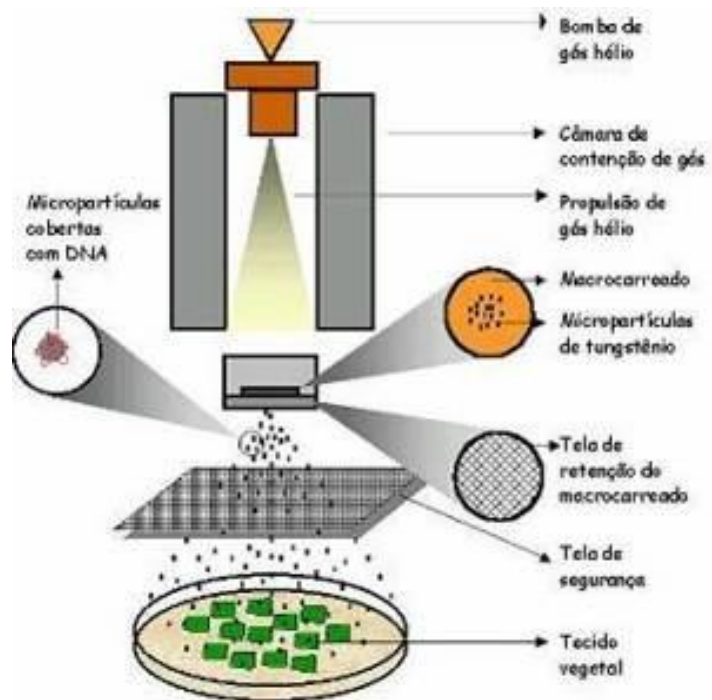


FIGURA 3a – Transferência direta de genes por meio do processo de biobalística (Carneiro et al., 2004).

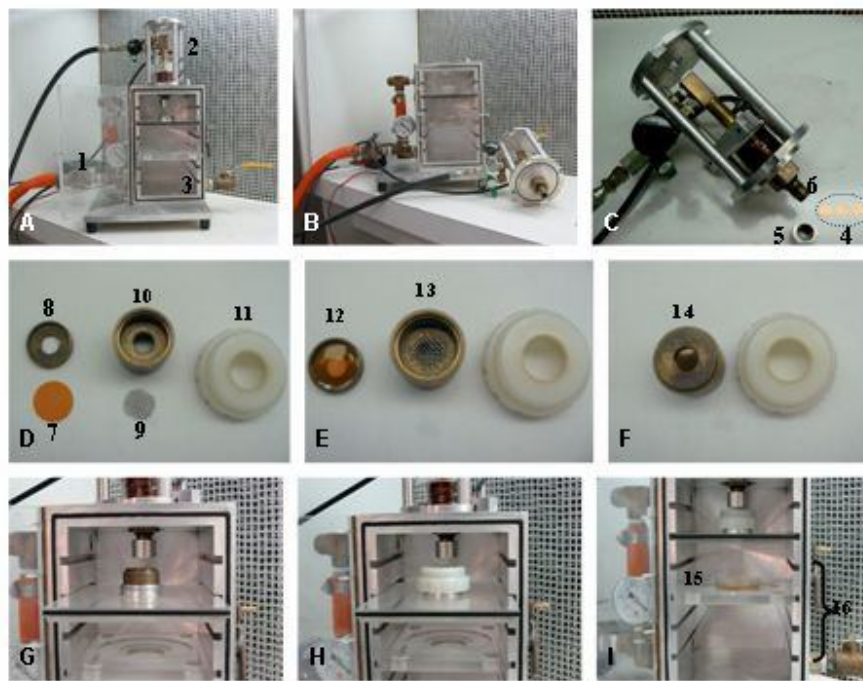


FIGURA 3b: Gene Gun utilizado para a transferência direta de genes. A: Vista geral do aparelho de bombardeamento de partículas - (1) controles para entrada de vácuo, (2) câmara para a contenção de gás hélio e controles para sua liberação, (3) câmara de vácuo; B: vista geral da câmara de contenção do gás hélio e da câmara de vácuo; C: detalhamento da câmara de contenção do gás hélio - (4) membranas de ruptura, (5) suporte das membranas de ruptura, (6) encaixe do suporte das membranas de ruptura dentro da câmara de gás hélio; D: Detalhe do suporte das micropartículas - (7) membrana macrocarreadora, (8) suporte para a membrana macrocarreadora, (9) tela de retenção da membrana macrocarreadora, (10) suporte da tela de retenção, (11) dispositivo que mantém todo o conjunto unido dentro da câmara de vácuo; E, F, G e H: montagem das peças mostradas em D, dentro da câmara de vácuo; I: colocação dos explantes dentro da câmara de vácuo para o bombardeamento de partículas - (15) explantes dentro de uma placa de Petri, (16) diferentes distâncias em que os explantes podem ser posicionados, relativos à posição das micropartículas cobertas com DNA.

Para a preparação das micropartículas, foram colocados, num microtubo, 60 mg de tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/Towanda – USA) e 1,0ml de etanol 70%. Essa reação foi misturada vigorosamente e mantida sob agitação lenta em vórtex por 20 minutos e, logo após, centrifugada a 14.000 rpm, durante cinco minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente. Foi adicionado 1 ml de água mili-Q estéril. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se, a 14.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida por duas vezes. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as micropartículas foram ressuspensas em 1,0ml de glicerol estéril 50% (v/v). As partículas foram armazenadas a -20°C.

Para a precipitação do DNA sob as micropartículas, 50µl da suspensão de micropartículas foram colocados num microtubo. Sob agitação lenta em vórtex, foram adicionados 5µl de DNA plasmidial, 50µl de cloreto de cálcio (2,5M) e 20µl de espermidina (0,1M). A solução foi colocada sob constante agitação em vórtex, por três minutos e sem agitação, à temperatura ambiente, por mais três minutos. Foi centrifugada, a 5.000 rpm, por 5 segundos e o sobrenadante foi retirado cuidadosamente. O pellet foi lavado com 150µl de etanol absoluto por três vezes. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 60µl de etanol absoluto. A solução foi homogeneizada vigorosamente. Alíquotas de 7µl foram distribuídas na região central de cada membrana dos macrocarreadores.

Foi utilizado como parâmetro de bombardeamento para milho 1.200 psi de pressão de gás hélio, 6cm entre a plataforma de liberação das partículas e os explantes e dois tiros por placa.

Antes do bombardeamento, os explantes foram subcultivados em placas com meio osmótico por 4 horas (BCI contendo 12% de sacarose).

3.1.4 Seleção de calos bombardeados e regeneração de plantas

Duas semanas após o bombardeamento, iniciou-se o processo de seleção dos calos bombardeados. Os mesmos foram transferidos para o meio de seleção BCI (citado acima) suplementado com diferentes concentrações (6 e 9 mg/L) de glufosinato de amônia (fosfotricina - PPT), composto ativo do herbicida Finale (AgrEvo). A cada duas semanas, esses calos foram selecionados, de acordo com seu desenvolvimento e subcultivados em meios de cultura BCI com concentrações aumentadas do composto acima citado. Para a maturação dos calos, foi utilizado o meio RM (4,3g/L MS sais e vitaminas, ácido 1-naftilacético ANA 1mg/L, 100mg/L myo-inositol, sacarose 30g/L, phitigel 3g/L e pH 5,8), suplementado com 6mg/L de glufosinato de amônia.

Para a regeneração de plantas, utilizou-se o meio MS, sem reguladores de crescimento (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3mg/L de glufosinato de amônia. Após o desenvolvimento da parte aérea e da raiz, plântulas de aproximadamente 5cm foram transferidas para casa de vegetação. Quando essas plantas estavam entre 10 e 15cm de altura, foram feitas aplicações do herbicida Finale (concentração: 1mg/L) para a eliminação de plantas escapes.

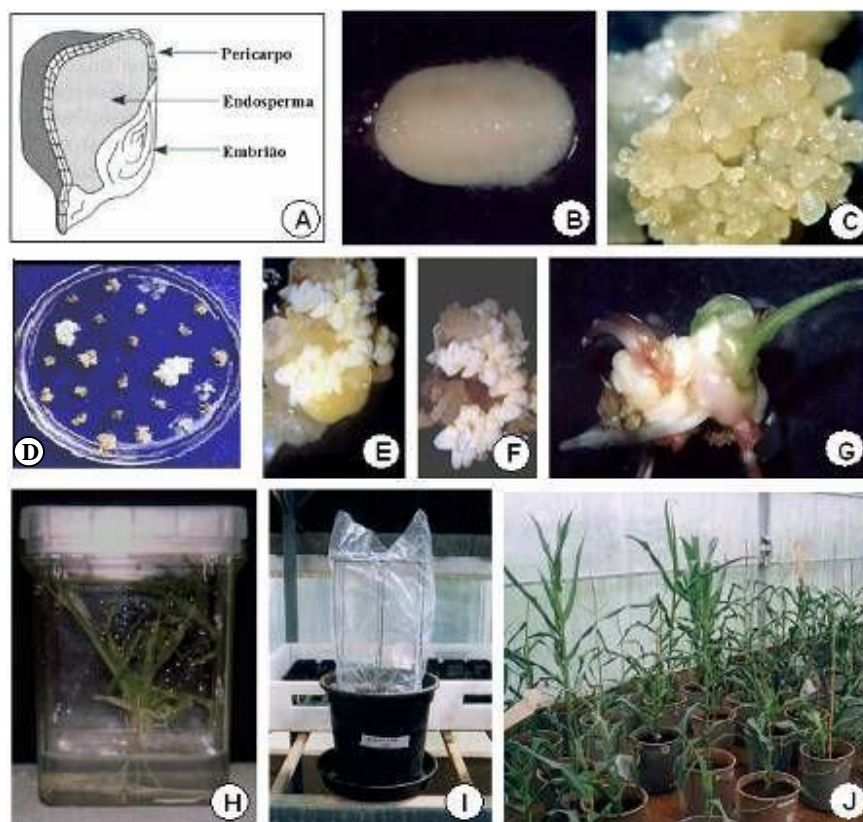


FIGURA 4: Formação de calos embriogênicos e regeneração de plantas de milho em cultura de tecido. (A) Grão do milho; (B) embrião imaturo de milho com 2 mm; (C) embriões imaturos após 3 semanas em meio de cultura M3; (D) calos bombardeados crescendo em meio com agente seletivo fosfotricina; (E, F) calos em processo de maturação em meio RM; (G) regeneração de plantas; (H) planta regenerada em frasco magenta; (I) aclimação de planta em casa de vegetação e (J) plantas de milho em casa de vegetação.

3.2 Análises moleculares

3.2.1 Extração de DNA genômico

Folhas de milhos transformados foram maceradas com nitrogênio líquido, com uso de graal e pistilo, e colocadas num microtubo de 1,5ml estéril. Foram adicionados 800µl de tampão CTAB (Tris-HCl 1M pH 7,5, NaCl 5M, EDTA 0,5M pH 8,0, CTAB e 2% de β-mercaptoetanol). As amostras foram

colocadas a 65°C por 1 hora. Foram acrescentados 600µl de clorofórmio-octanol (24:1) e homogeneizando-se por 15 minutos. Após centrifugação, por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo. Para a precipitação do DNA, 800 µl de isopropanol foram adicionados e as amostras foram armazenadas, por 1 hora, a -20°C. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado. Foram acrescentados 180 µl de etanol 70%. Após centrifugação por 2 minutos, o sobrenadante foi retirado. As amostras foram colocadas numa centrífuga a vácuo por 5 minutos. Foram adicionados 100µl de TE pH 8,0 (10mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA e 1% RNase).

Para a quantificação do DNA, uma alíquota de DNA foi aplicada em gel de agarose 1%, utilizando marcador de peso molecular (10ng/µl).

3.2.2 PCR – reação em cadeia da polimerase

Para a reação de PCR, preparou-se um volume de 25µl composto de tampão de PCR 10X, 2mM de MgCl₂, 1,0 µM de dNTP, 1,0 µM de cada um dos primers (reverse e forward), 25 ng de DNA e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amostras foram colocadas num termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 2 minutos, a 94°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 15 segundos, anelamento dos *primers*, a 55°C, por 15 segundos e extensão a 72°C, por 30 segundos. No final dos ciclos, a temperatura se manteve por 4°C.

Para a observação dos produtos amplificados por eletroforese, foi preparado um gel de agarose de 1,5% e as amostras foram aplicadas no mesmo. O tempo de corrida foi de 1 hora e 30 minutos a 108 v em tampão de corrida TAE (90mM Tris-acetato e 1mM EDTA pH 8,0). O gel foi corado com brometo

de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado por um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

3.2.3 Extração de RNA total com trizol

Folhas de milhos transformados foram maceradas com nitrogênio líquido, com uso de graal e pistilo previamente esterilizados, e colocadas num microtubo estéril de 2 ml. Foram adicionados 1,0 ml de trizol (Invitrogen) e homogeneizados por 2 minutos no vórtex, mantendo-se as amostras no gelo. Foram acrescentados 200µl de clorofórmio, homogeneizados e centrifugados, a 13.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo. Foram acrescentados, novamente, trizol e clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas rapidamente no vórtex e centrifugadas, por mais 10 minutos, a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo, e foram adicionados 200µl de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual se adicionou 1,0 ml de etanol 95% (duas vezes o volume). A amostra foi centrifugada por 10 minutos, a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 100µl de água ultrapura-DEPC e 0,1% de SDS.

A qualidade do RNA foi nítida em gel de agarose de 1,5% corado com brometo de etídio.

3.2.4 RT – PCR (transcriptase reversa)

Para a reação de RT (transcriptase reversa), utilizou-se o kit “SuperScript™ III RNase H⁻ Reverse Transcriptase – Invitrogen”. De acordo com o protocolo do fabricante, foram colocados num microtubo 1µl de Oligo dT, 15 µl de RNA total e 1 µl de dNTPs. Essa reação foi incubada, a 70°C, por 5 minutos. Foram acrescentados 4 µl de tampão, 1 µl de DTT (ditiotreitól), 1 µl de

RNase Out e 1 µl da enzima transcriptase reversa (RT). Incubou-se essa reação a 50°C, por 2 horas e a 70°C, por 15 minutos, em termociclador.

Para o PCR, foram colocados, num microtubo tampão de PCR 10X, 100 µM de cada dNTPs, 2 mM de cloreto de magnésio, 0,2 µM de cada um dos *primers* (reverse e forward), 1 unidade da enzima Taq polimerase, água estéril e 25 ng de cDNA. A reação foi colocada num termociclador, a 94°C, durante 10 segundos; 50°C, por 10 segundos e 72°C, por 10 segundos, ao longo de 35 ciclos e extensão de 72°C, por 3 minutos.

3.3 Testes fisiológicos

3.3.1 Estresse de alumínio em câmara de crescimento

Após 24 horas em solução nutritiva, metade do número de plântulas foi transferida para os mesmos recipientes contendo a solução nutritiva completa + $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ e a outra metade permaneceu em solução nutritiva sem alumínio.

Sementes das plantas transgênicas (linhagem L3) foram desinfestadas em solução de cloro ativo [1%], colocadas em papel de germinação umedecido com água destilada e germinadas em câmara de crescimento, com temperatura controlada a 27°C. Após quatro dias, as plântulas foram acondicionadas em bandejas, dispostas sobre um recipiente, de modo que suas raízes ficaram submersas em solução nutritiva completa (Magnavaca, 1982), pH 4,0, sem alumínio. Após 24 horas em solução nutritiva, foram feitas medições das raízes. Metade do número de plântulas foi transferida para os mesmos recipientes contendo solução nutritiva completa + 222 µM de $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, e a outra metade foi colocada em recipientes contendo solução nutritiva sem alumínio. Fizeram-se medições das raízes após os períodos de 48 e 120 horas sob estresse.

Para esse experimento, foram utilizadas 28 sementes da linhagem L3 como controle negativo, 12 sementes do evento CNPMS 299 (apenas seis germinaram), 14 sementes de CNPMS 300, 28 sementes de CNPMS 301 e 10 sementes de CNPMS 302 (apenas duas germinaram).

3.3.2 Estresse salino

Sementes de plantas transgênicas (linhagem L3) foram desinfestadas com uma solução de água sanitária comercial 50%, enxaguadas e colocadas, por uma noite, em solução de fungicida Benlat. Após a esterilização, foram colocadas para germinar em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), por uma semana. As plântulas de milho foram, então, transferidas para magentas contendo o meio MS suplementado com quatro diferentes concentrações de NaCl, 0, 100, 200 e 300mM. Essas permaneceram por um período de 25 dias sob o estresse e foram fotografadas.

Para esse experimento, foram utilizadas 20 sementes de cada planta transgênica (quatro eventos: CNPMS 299, 300, 301 e 302) e 20 sementes de milho L3 (controle negativo). Essas foram distribuídas entre as quatro concentrações de NaCl, sendo 5 sementes por concentração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram realizadas transformações genéticas de milho, visando à produção de plantas mais tolerantes aos estresses de alumínio e salino. Para isso, utilizou-se o gene ADP/ATP translocase de milho, o qual foi prospectado em raízes de milho sob estresse de Al. Foram realizadas análises fisiológicas dessas plantas sob o estresse de alumínio e salino.

4.1 Seleção dos calos bombardeados, regeneração de plantas e aplicação de PPT

Após passarem por um processo de seleção com PPT (fosfinitricina - glufosinato de amônia) na cultura de tecidos, os calos bombardeados e com melhor desenvolvimento foram transferidos para um meio de maturação e, em seguida, de regeneração. Seis plantas regeneradas foram transferidas e aclimatadas em casa de vegetação. Após aplicação de PPT, uma planta morreu e foi considerada como escape na cultura de tecidos.

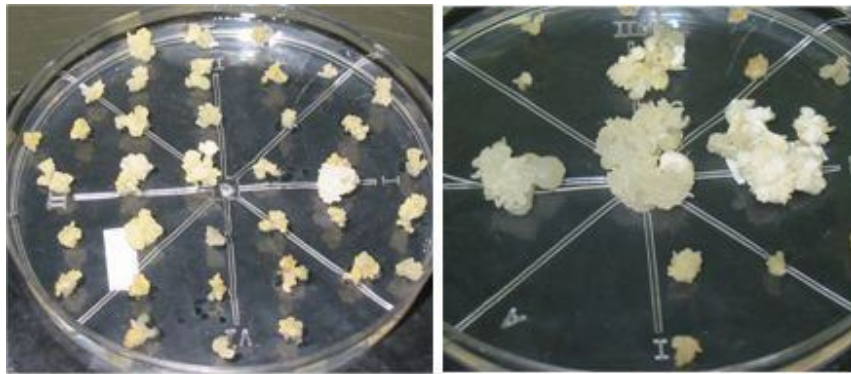


FIGURA 5: Processo de seleção de calos embriogênicos de milho transformados. (A): calos em seleção cultivados em meio suplementado com 9 mg/L de PPT; (B): calos em fase de maturação cultivados em meio RM suplementado com 6 mg/L de PPT.



FIGURA 6: Aplicação de PPT em plantas possivelmente transgênicas em casa de vegetação. Plantas sobreviventes resistentes a fosfotricina (PPT)

4.2 PCR

Por meio da análise do PCR, foi possível detectar cinco eventos diferentes contendo o gene ADP/ATP translocase (CNPMS 298, CNPMS 299, CNPMS 300, CNPMS 301 e CNPMS 302). Utilizando-se *primers* específicos do gene, ocorreu a amplificação de uma região com 1.200 pb correspondentes ao gene ADP/ATP translocase. Apesar do controle negativo, planta não-transgênica, apresentar o gene ADP/ATP translocase em seu genoma, não houve amplificação do mesmo no PCR. Isso sugere que o gene nativo pode apresentar íntrons, gerando um tamanho de seqüência muito grande para ser amplificada pelas condições utilizadas no presente experimento (Figura 7).

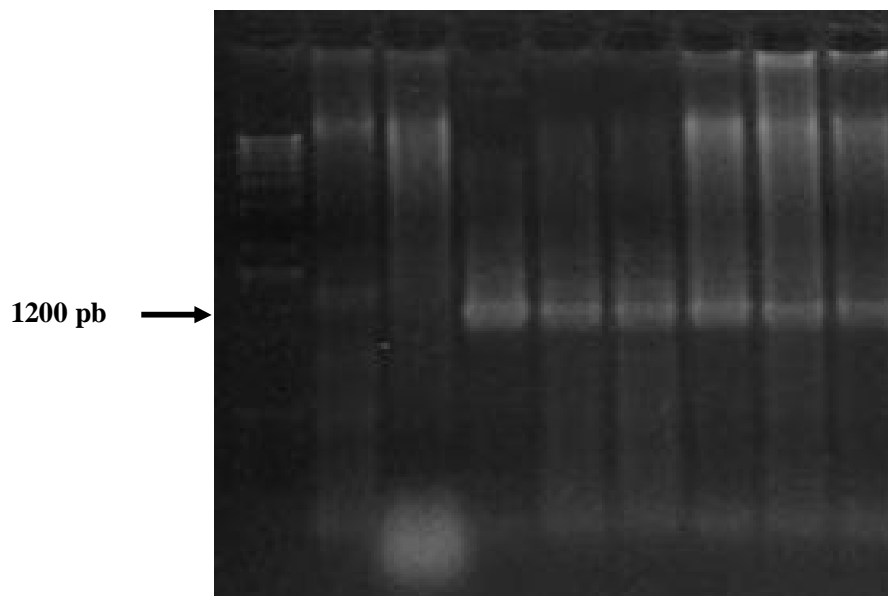


FIGURA 7: PCR de plantas transgênicas de milho contendo a construção UBI:ADP/ATP translocase. PCR realizado com os *primers* descritos na Tabela 1, amplificando uma banda de 1200pb. M: Marcador molecular (1 Kb); C: controle negativo; P: plasmídeo; amostras 1 a 5: DNA de plantas transgênicas em casa de vegetação: 1: CNPMS 298; 2: CNPMS 299; 3: CNPMS 300; 4: CNPMS 301; 5: CNPMS 302. Gel de agarose 1%.

4.3 RT – PCR

Para avaliar a expressão do gene ADP/ATP translocase nas plantas transformadas, realizou-se um RT-PCR. A superexpressão desse gene foi observada nos eventos CNPMS 299, 301 e 302, em comparação com o controle negativo, em que não houve superexpressão (Figura 8). *Primers* da actina (gene constitutivo) foram usados como controle. Pode-se observar que a expressão da actina foi igual tanto na planta controle como nos eventos transgênicos.

Para mostrar a superexpressão de um gene transportador de fosfato em plantas de arroz, Ming et al. (2005) também utilizaram, no RT-PCR, *primers* da actina como controle.

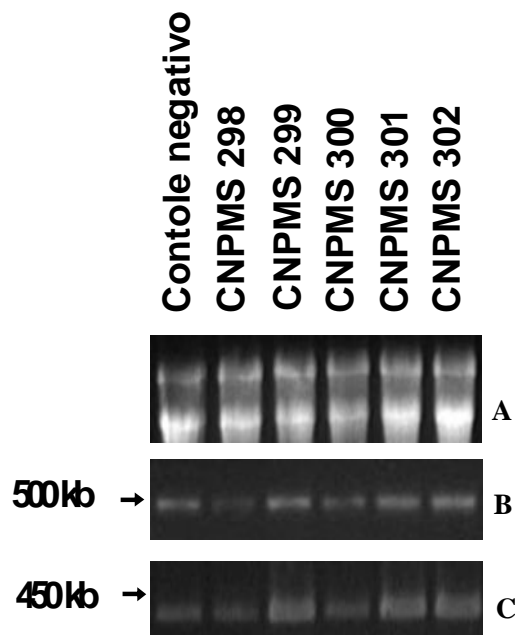


FIGURA 8: Géis de RNA e RT-PCR. (A) Gel de quantificação de RNA total; (B) gel de RT-PCR com *primers* do gene da actina, controle negativo; (C) gel de RT-PCR com *primers* do gene ADP/ATP translocase.

4.4 Testes fisiológicos

4.4.1 Estresse de alumínio

Com o objetivo de avaliar se o gene em estudo confere maior tolerância ao estresse de alumínio, as plantas transgênicas (eventos CNPMS 299, 300, 301 e 302) e plantas controle (não transformadas) de milho, da linhagem L3, foram submetidas ao estresse de Al. Alves et al. (2004) investigaram a tolerância de diferentes cultivares de milho ao Al, dentre eles a linhagem L3. Em seus estudos, seis linhagens de milho foram cultivadas em solução nutritiva contendo quatro concentrações de Al (0, 55, 111 e 222 μM), durante 5 dias. Nesse período, foram feitas medições das raízes e os resultados mostraram que a linhagem de milho L3 é considerada de média tolerância ao alumínio. Os autores concluíram também que a característica de tolerância foi melhor avaliada sob a concentração de 222 μM de Al, sugerindo o uso dessa concentração em outros trabalhos.

Nos testes de tolerância ao Al foi utilizada, portanto, a concentração de 222 μM de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, de acordo com Alves et al. (2004). A maioria dos métodos disponíveis para selecionar linhagens quanto à tolerância ao Al baseia-se em observações do crescimento das raízes em solução nutritiva. Para a avaliação da tolerância ao alumínio, foram feitas comparações entre o crescimento das raízes de plantas transgênicas e plantas controle sob o estresse de Al.

Na primeira medida radicular, realizada antes de as plantas serem colocadas sob estresse (0 h de estresse), a maioria das plantas controle apresentava raízes maiores que a das plantas transgênicas (Tabela 2). Após 48 horas sob estresse de Al, as plantas controle apresentaram, em média, um crescimento radicular diário de 25%, enquanto os eventos transgênicos CNPMS 299, 300, 301 e 302 apresentaram, respectivamente, 46%, 32%, 33% e 23%

(Figura 9B). Entretanto, entre 48 e 120 horas de estresse, a média do crescimento radicular diário foi de 4% nas plantas controle, 5% no evento CMPMS 299; 4% no CNPMS 300; 5% no CMPMS 301 e 3% no CMPMS 302.

TABELA 2: Comprimento da raiz principal em plântulas de milho L3 (Controle negativo: L3 e transgênicas: CNPMS 299 - 302), em 0, 48 e 120 horas sob estresse de Al.

Genótipo	Planta	Medida da raiz antes do estresse - 0h (em mm)	Medida da raiz após 48h sob estresse (em mm)	Medida da raiz após 120h sob estresse (em mm)
L3 controle	1	86	134	155
	2	103	158	185
	3	101	149	173
	4	111	164	190
	5	102	140	156
	6	96	140	154
	7	94	139	153
	8	80	130	143
	9	92	136	155
	10	104	156	170
	11	108	152	165
	12	92	137	146
	13	110	169	190
	14	74	115	135
CNPMS 299	1	59	103	120
	2	28	60	70
	3	32	60	65
CNPMS 300	1	80	122	135
	2	73	116	126
	3	94	140	154
	4	60	105	123
	5	55	95	115
	6	60	104	114
	7	63	107	120
CNPMS 301	1	56	100	115
	2	75	121	133
	3	70	119	135
	4	85	130	146
	5	59	100	112
	6	79	116	133
	7	60	96	117
	8	45	88	108
	9	66	104	109
	10	81	122	129
	11	65	113	136
	12	72	119	137
	13	56	95	116
	14	57	94	111
CNPMS 302	1	60	87	96

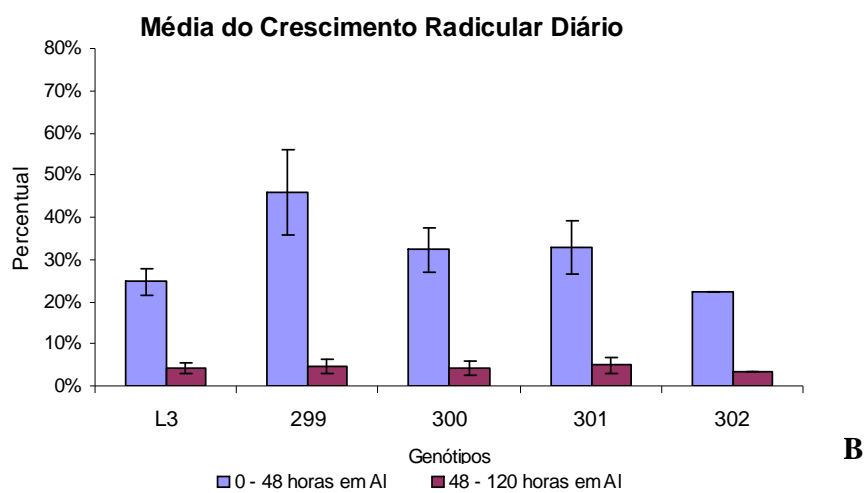
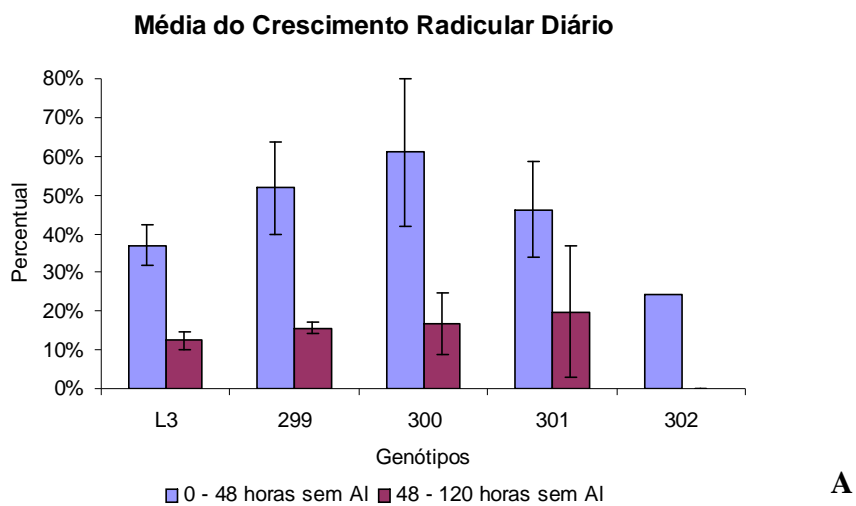


FIGURA 9: (A) Média do crescimento diário das raízes de plantas controle e transgênicas em solução nutritiva sem AI. (B) Média do crescimento diário das raízes de plantas controle e transgênicas entre 0 e 48 horas e 48 e 120 horas de estresse de AI. Controle negativo: L3 e transgênicas: CNPMS 299 - 302.

Nas primeiras 48 horas de estresse, observou-se um crescimento diário das raízes maior nos eventos transgênicos em relação às plantas controle. Todavia, as raízes das plantas não-transgênicas estavam mais desenvolvidas que as raízes das transgênicas no início do estresse. Esse dado indica que o maior índice de crescimento das plantas transgênicas, observado nos primeiros dois dias de estresse, pode ter sido devido ao atraso das mesmas durante a germinação, utilizando suas reservas nutricionais no período inicial do estresse. No período entre 48 e 120 horas, ocorreu uma diminuição do crescimento radicular diário de todas as plantas, controle não-transgênico e plantas transgênicas. Todas as plantas apresentaram aproximadamente o mesmo índice de alongamento. Esses resultados sugerem que a superexpressão do gene ADP/ATP translocase não induziu tolerância ao Al nessas plantas transgênicas de milho. A comparação da média do crescimento radicular diário entre plantas crescidas em solução nutritiva sem Al e plantas crescidas sob Al foi mostrada na Tabela 3 e na Figura 9A e B.

TABELA 3: Comparação entre o crescimento médio radicular entre plantas controle e transgênicas crescidas em solução nutritiva sem Al e com Al, no período de 0 a 48 horas e de 48 a 120 horas.

Genótipo	Média do crescimento diário das raízes entre 0 e 48 horas em solução nutritiva (em %)		Média do crescimento diário das raízes entre 48 e 120 horas em solução nutritiva (em %)	
	Sem Al	Com Al	Sem Al	Com Al
L3 controle	37	25	19	4
CNPMS 299	52	46	24	5
CNPMS 300	61	32	25	4
CNPMS 301	46	33	30	5
CNPMS 302	24	23	morreu	3

Foram observadas diferenças radiculares entre plantas que cresceram em solução nutritiva sem Al e plantas crescidas sob Al. Dentre essas diferenças, constatou-se que as raízes das plantas crescidas sem Al estavam menores do que as plantas crescidas sob Al, e também apresentavam mais pêlos radiculares e espessura maior. Essas observações indicam que o alumínio causou toxidez nas raízes, afetando o crescimento e o desenvolvimento das mesmas (Figura 10).



FIGURA 10: A) Plântulas crescidas em solução nutritiva suplementada com 222 μM de Al durante 5 dias; B) plântulas crescidas em solução nutritiva sem Al.

Mazzocato et al. (2002) avaliaram o crescimento das raízes em dois genótipos de milho (C929 - tolerante e P32R21 - sensível) sob diferentes concentrações de Al (0, 2 e 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\cdot 18\text{H}_2\text{O}$), durante 48 horas. Por meio da comparação do crescimento radicular entre os genótipos testados, esses autores puderam avaliar o grau de tolerância ao Al nos mesmos.

A produção de plantas monocotiledôneas tolerantes ao alumínio, por meio da superexpressão de genes heterólogos relacionados a este estresse, foi realizada com sucesso apenas em cevada (Delhaize et al., 2004) e em sorgo (Brandão, 2007*). Nesses trabalhos, os autores utilizaram o gene maior de tolerância ao estresse de Al isolado de trigo, ALMT1. No trabalho realizado por Brandão et al. (2007), as raízes das plantas de sorgo foram medidas e avaliadas sob estresse de Al. O resultado mostrou grande diferença de crescimento das

plantas transgênicas em relação às não-transgênicas (controle) quando submetidas ao estresse de Al. As plantas expressando o gene ALMT1, sob estresse de Al, cresceram entre 74% e 112%, mais do que as não-transgênicas nas mesmas condições.

Apesar de a linhagem L3 apresentar média tolerância ao Al, a transformação genética de plantas de milho L3, com o gene ADP/ATP translocase, poderia aumentar ainda mais a tolerância da mesma ao Al, em comparação com plantas do controle negativo da mesma linhagem. Essa hipótese estaria relacionada ao fato de que a superexpressão do gene ADP/ATP translocase, induzido pelo alumínio em raízes de milho, poderia conferir o aumento dessa tolerância.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, não houve, aparentemente, influência do gene ADP/ATP translocase no aumento de tolerância nas plantas transgênicas em relação às plantas controle (não transformadas). Porém, esses resultados não podem ser considerados definitivos, já que o número de sementes utilizadas foi pequeno devido à baixa produção das mesmas pelas plantas transgênicas. Para a confirmação dessa hipótese, um outro experimento de estresse de alumínio pode ser realizado com a progênie dessas plantas (como repetição) ou, então, um experimento de transformação genética de linhagens de milho mais sensíveis ao Al, como, por exemplo, a L53 identificada por Alves et al. (2004).

4.4.2 Estresse salino

Para avaliar se o gene em estudo confere tolerância ao estresse salino, plantas transgênicas de milho foram crescidas em meio de cultura MS, contendo diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 200 e 300 mM) por 25 dias. Em um experimento preliminar, realizado no laboratório de Biologia Celular da Embrapa Milho e Sorgo, com plantas de milho da linhagem L3 não

transformadas na presença de várias concentrações de NaCl (curva de crescimento), observou-se que, em concentrações acima de 200 mM de NaCl, as plantas de milho L3 cessaram seu crescimento após 25 dias (Petrillo, 2007*).

Nas concentrações de 0 a 100 mM de NaCl, não houve diferença de crescimento e desenvolvimento entre as plantas transgênicas e as plantas controle (Figura 11A e B). No entanto, a 200 mM, as plantas transgênicas dos eventos CNPMS 300, 301 e 302 cresceram mais do que as plantas controle (Figura 11C). Em concentrações de 300 mM, as plantas transgênicas do evento CNPMS 300 cresceram, visualmente, três vezes mais do que as plantas controle - não transformadas (Figura 11D). As raízes e as folhas das plantas controle apresentavam sinais de ressecamento e coloração marrom, o que não foi observado nas plantas transgênicas. As raízes dessas plantas estavam pequenas e pouco desenvolvidas, sugerindo que elas sofreram estresse iônico e osmótico. Segundo Hasegawa et al. (2000), altas concentrações salinas podem afetar o crescimento e o desenvolvimento de folhas, devido à acumulação de íons tóxicos na parte aérea.

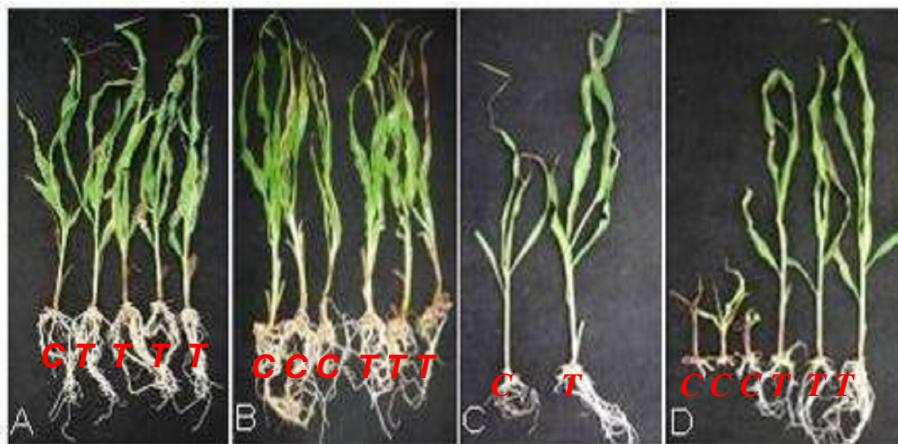


FIGURA 11: Plantas crescidas em meio MS com diferentes concentrações de NaCl. A) 0 mM; B) 100mM; C) 200 mM e D) 300mM. C: plantas controle – L3; T: plantas transgênicas.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a superexpressão do gene ADP/ATP translocase pode conferir tolerância à salinidade em plantas de milho. Hashimoto et al. (1993), em seus estudos com arroz, mostraram que a expressão do gene ADP/ATP translocase foi aumentada em culturas celulares submetidas ao estresse salino - 2% de NaCl por 24h - e à baixa temperatura - 10°C por 5 dias, sugerindo que esse gene possa estar relacionado ao estresse salino.

Alguns autores estudaram a relação do ADP/ATP translocase com estresses abióticos. Fratianni et al. (2001) mostraram que houve um aumento na atividade dos transportadores de ADP/ATP em células de batata adaptada ao estresse hídrico. Esse resultado sugere que a adaptação da mitocôndria a esse estresse provoca um aumento na permeabilidade da membrana. No estudo com rãs tolerantes ao frio, Cai et al. (1997) concluíram que elevados níveis do ADP/ATP translocase podem minimizar a depleção de ATP durante o frio e podem facilitar o rápido re-estabelecimento do metabolismo oxidativo quando as rãs são congeladas.

De acordo com Sugimoto et al. (2004), os genes que codificam proteínas ou enzimas que participam de rotas metabólicas são induzidos por estresses ambientais. Esses autores afirmam que, em resposta a estresses como salinidade, seca, frio e alta temperatura, o ADP/ATP translocase pode conduzir energia efetivamente para os sistemas de defesa contra estresses.

Durante o período de estresse, as plantas podem sofrer um desequilíbrio energético celular. A proteína de membrana ADP/ATP translocase, sendo responsável pela troca de ADP e ATP, pode estar relacionada com o descontrole de energia. A partir dos resultados desse experimento e de dados encontrados na literatura, pressupõe-se que a superexpressão do gene ADP/ATP translocase controle os níveis de ATP celular, ajudando na manutenção do metabolismo e no equilíbrio energético durante estresses abióticos.

5 CONCLUSÕES

Foram obtidas cinco plantas transgênicas de milho, tendo três delas mostrado superexpressão do gene ADP/ATP translocase no RT-PCR.

A hipótese de que o gene ADP/ATP não esteja relacionado com tolerância ao Al não pode ser descartada, sendo necessários outros experimentos de estresse de alumínio utilizando a progênie dessas plantas transgênicas.

O gene ADP/ATP pode conferir tolerância à salinidade em milho, sendo necessárias análises quantitativas para confirmar essa hipótese.

Elevados níveis da proteína ADP/ATP translocase podem controlar os níveis de ATP, mantendo o equilíbrio energético nas células durante o estresse.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V. M. C.; PITTA, G. V. E.; PARENTONI, S. N.; SCHAFFERT, R. E.; COELHO, A. M.; MAGALHÃES, J. V. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 311-318, 2004.

BAKER, A.; LEAVER, C. J. Isolation and sequence analysis of a encoding the ATP/ADP translocator of *Zea mays* L. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 16, 1985.

BARROS, M. F. C.; SANTOS, P. M.; SILVA, A. J. Recuperação de solos afetados por sais usando água de qualidade inferior. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, p. 310-313, 2005.

BATHGATE, B.; BAKER, A.; LEAVER, C. Two genes encode the adenine nucleotide translocator of maize mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 183, p. 303-310, 1989.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 431-434, 2000.

BORSANI, O.; VALPUESTA, V.; BOTELLA, M. A. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 101-115, 2003.

CAI, Q.; GREENWAY, S. C.; STOREY, K. B. Differential regulation of the mitochondrial ADP/ATP translocase gene in wood frogs under freezing stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1353, p. 69-78, 1997.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2004. 44p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 32).

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 Comparative Experiments on The Nitrogen Sources. **Scientia Sinica**, Beijing, v. 18, p. 659-668, 1975.

CRAMER, G. R.; LYNCH, J.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Influx of Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. **Plant Physiology**, v. 83, p. 510-516, 1987.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. Uptake on 3nvironmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; HEBB, D. M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high – level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **PNAS**, v. 101, n. 42, p. 15249-15254, 2004.

DRUMMOND, R. D.; GUIMARÃES, C. T.; FELIX, J.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E.; MENOSSI, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 221-230, 2001.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 531-541, 2001.

EL-ITRIBY, H. A.; ASSEM, S. K.; HUSSEIN, E. H. A.; ABDEL-GALIL, F. M.; MADKOUR, M. A. Regeneration and transformation of egyptian maize inbred lines via immature embryo culture and a biolistic particle delivery system. **In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant**, v. 39, p. 524-531, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cerrado**. 2004. Disponível em:
<http://www.embrapa.br/linhas_de_acao/ecossistemas/cerrado/index_html/mostra_documento>. Acesso em: 11 de junho de 2007.

EMBRAPA CERRADOS: CONHECIMENTO, TECNOLOGIA E COMPROMISSO AMBIENTAL. **Documentos 4/Embrapa Cerrados**, p.1-43, Planaltina-DF, 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - TABULEIROS COSTEIROS. Variedades e híbridos de milho no nordeste brasileiro. 2002. Disponível em:
<<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=926>>. Acesso em: 4 de junho de 2007.

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; KONDO, H.; MATSUMOTO, H. Protective roles of two aluminum (Al) induced genes, *HSP150* and *SED1* of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 159, p. 99-105, 1998.

FAO. **Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/intro.htm>>. Acesso em: 06 de junho de 2007.

FRAME, B.R.; PAQUE, T.; WANG, K. Maize (*Zea mayz* L.), **Methods in Molecular Biology**, v. 343: Agrobacterium Protocols, 2/e, volume 1, p. 185-199, 2006.

FRATIANNI, A.; PASTORE, D.; PALLOTA, M. L.; CHIATANTE, D.; PASSARELLA, S. Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells. **Bioscience Reports**, v. 21, n° 1, p. 81-91, 2001.

GORDON-KAMM, W. J.; SPENCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ADAMS, T. R.; DAINES, R. J.; START, W. G.; O'BRIAN, J. V.; CHAMBERS, S. A.; ADAMS, J. W. R.; WILLETS, N. G.; RICE, T. B.; MACKEY, C. J.; KRUEGER, W.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants **Plant Cell**, Rockville, v. 2, n. 7, p. 603-618, July 1990.

HAFERKAMP, I.; HACKSTEIN, J.H.P.; VONCKEN, F.G.J.; SCHMIT, G.; TJADEN, J. Functional integration of mitochondrial and hydrogenosomal ADP/ATP carriers in the *Escherichia coli* membrane reveals different biochemical characteristics for plants, mammals and anaerobic chytrids. **Eur. J. Biochemistry**, v. 269, p. 3172-3181, 2002.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463-499, 2000.

HASHIMOTO, H.; NISHI, R.; UMEDA, M.; UCHIMIYA, H.; KATO, A. Isolation and characterization of a rice cDNA clone encoding ATP/ADP translocator. **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 163-164, 1993.

IACOBAZZI, V.; PALMIERI, F. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the ADP/ATP carrier from wheat (*Triticum turgidum*). **Plant Physiology**, v. 107, p. 1473, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**. Disponível em:

<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=t&o=10&i=P>>. Acesso em: 07 de junho de 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento da produção agrícola**. 2007. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200705_5.shtm>. Acesso em: 07 de junho de 2007.

ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T. Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. **Plant Cell Physiology**, v. 39(5), p. 516-525, 1998.

KLEIN, T.M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of Aluminum Tolerance and Phosphorous Efficiency. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and soil**, v. 274, p. 175-195, 2005.

KURLAND, C. G.; ANDERSSON, S. G. E. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 786-820, 2000.

LALOI, M. Plant mitochondrial carriers: an overview. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 918-944, 1999.

LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v. 160, p. 1-13, 2000.

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

MAZZOCATO, A. C.; ROCHA, P. S. G.; SERENO, M. J. C. M.; BOHNEN, H.; GRONGO, V.; BARBOSA, J. N. F. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, v. 32, p. 19-24, 2002.

MING, F.; MI, G. H.; LU, Q.; YIN, S.; ZHANG, S. S.; GUO, B.; SHEN, D. L. Cloning and characterization of cDNA for the *Oryza sativa* phosphate transporter. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 401-411, 2005.

MOFFAT, A. S. Engineering plants to cope with metals. **Science**, v. 285, p. 369-370, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEOCLEOUS, D.; VASILAKAKIS, M. Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. 'Autumm Bliss'). **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 282-289, 2007.

NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v. 109, p. 735-742, 1995.

O'KENNEDY, M. M.; BURGER, J. T.; BERGER, D. K. Transformation of elite white maize using the particle inflow gun and detail analysis of a low-copy integration event. **Plant Cell Rep**, v. 20, p. 721-730, 2001.

OHTA, M.; HAYASHI, Y.; NAKASHIMA, A.; HAMADA, A.; TANAKA, A.; NAKAMURA, T.; HAYAKAWA, T. Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. **FEBS Letters**, v. 532, p. 279-282, 2002.

PITTA, G. V. E.; COELHO, A. M.; ALVES, V. M. C.; FRANÇA, G. E.; MAGALHÃES, J. V. **Cultivo do milho** - calagem e gessagem do solo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 53).

REISER, J.; LINKA, N.; LEMKE, L.; JEBLICK, W.; NEUHAUS, H.E. Molecular Physiological Analysis of the Two Plastidic ADP/ATP Transporters from Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.136, p. 3524-3536, 2004.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, n. 3, p. 407-421, 2004.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v. 37, p. 645-653, 2004.

SUGIMOTO, M.; SAIKI, Y.; ZHANG, D.; KAWAI, F. Cloning and characterization of preferentially expressed genes in an aluminum-tolerant mutant derived from *Penicillium chrysogenum* IFO4626. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, p. 137-142, 2004.

TAYLOR, G. J. Overcoming barriers to understand cellular basis of aluminum resistance. **Plant and Soil**, v. 171, p. 89-103, 1995.

VILARINHO, A. A. Densidade e espaçamento como fatores de produtividade na cultura do milho. **Agroonline.com.br**, 2005. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=237>>. Acesso em: 05 de junho de 2007.

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazil Journal Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 129-143, 2005.

WANG, K.; FRAME, B.; MARCELL, L. Maize genetic transformation, in plant genetic engineering: improvement of food crop. **ScienceTech Publications**, p. 175-217, 2003.

WINNING, B. M.; DAY, C. D.; SARAH, C. J.; LEAVER, C.J. Nucleotide sequence of two cDNAs encoding the adenine nucleotide translocator from *Zea mays* L. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 305-307, 1991.

ZHU, C.; SCHRAUT, D.; HARTUNG, W.; SCHÄFFNER, A. R. Differential responses of maize *MIP* genes to salt stress and ABA. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2971-2981, 2005.