

**SUPEREXPRESSION EM PLANTAS  
TRANSGÊNICAS DE MILHO DO GENE  
*SbMATE*, QUE CONFERE TOLERÂNCIA  
AO ALUMÍNIO EM SORGO**

**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**2010**

**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**SUPEREXPRESSÃO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MILHO DO  
GENE *SbMATE*, QUE CONFERE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM  
SORGO**

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

Orientadora

PhD. Andréa Almeida Carneiro

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

Pôssa, Kátia Ferreira.

Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene  
*SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio em sorgo / Kátia  
Ferreira Pôssa. – Lavras : UFLA, 2010.

108 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Andréa Almeida Carneiro.

Bibliografia.

1. *Sorghum bicolor*. 2. Toxicidade. 3. Transformação genética.  
4. Análise molecular. 5. Cultura de tecido vegetal. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.523

**KÁTIA FERREIRA PÔSSA**

**SUPEREXPRESSION EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE MILHO DO  
GENE *SbMATE*, QUE CONFERE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM  
SORGO**

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2010

Dr. Newton Carneiro Portilho                      EMBRAPA/CNPMS

Dra. Cláudia Teixeira Guimarães                      EMBRAPA/CNPMS

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva                      UFLA

Dra. Andréa Almeida Carneiro  
EMBRAPA/CNPMS  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais Vagner e Luiza.

**Dedico**

**"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."**

**(Anatole France)**

Aos meus queridos Joel, Kenia  
e Luiz Carlos.

**Ofereço**

## AGRADECIMENTOS

Após mais uma conquista importante na minha vida, gostaria de agradecer veemente:

A Deus, pela fé que me mantém viva e fiel à vida honesta de trabalho e estudo.

À Universidade Federal de Lavras, através do curso de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o Mestrado.

À Fundação Mcknight, Fapemig e CNPq pelo suporte financeiro.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pela oportunidade de conduzir os experimentos nessa instituição.

Um especial agradecimento a minha querida orientadora Dr<sup>a</sup>. Andrea Almeida Carneiro, pelo ensinamento, compreensão, confiança, incentivo, amizade, humildade e por ter me recebido junto ao meu trabalho, de forma profissional e materna.

Aos Pesquisadores Newton Portilho Carneiro, Cláudia Teixeira Guimarães, Jurandir Vieira de Magalhães, pela co-orientação, acompanhamento do trabalho, recomendações valiosas e por todas as sugestões e correções.

Ao Dr. Luciano Vilela Paiva pela confiança.

Ao Dr. Antônio Carlos de Oliveira pelo apoio estatístico.

Aos funcionários e estagiários do Núcleo de Biologia Aplicada, pelos momentos compartilhados.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, que contribuíram para a minha formação científica.

A todos do Laboratório Central de Biologia Molecular, pelos momentos compartilhados, em especial a Evânia, sempre presente.

Aos funcionários da EMBRAPA Milho e Sorgo, especialmente Célio, Gislene, Ubiraci, Ray, Fabiane e Sr. Joaquim, pela disponibilidade na condução deste trabalho. E ao Celso pelas ajudas indiretas na conclusão deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, em especial a Valdênia, muito obrigada por tudo.

À Monalisa e Maíra pela ajuda irrestrita neste trabalho.

Às minhas irmãs de república, por tudo. Em especial a Bárbara pela companhia constante.

Aos meus tios Hely e Isabel pela acolhida em Lavras.

À minha amada irmã Kenia e meu sobrinho lindo, pela compreensão nas minhas ausências.

Ao meu querido Joel que me apoiou nos diversos fins de semana em que fiquei trabalhando nesta dissertação, por todo amor, compreensão, paciência e por compartilhar comigo a sua vida.

Acima de tudo à minha família, em especial aos meus pais Vagner e Luiza, que souberam entender a minha ausência nos muitos momentos desde que ingressei no mestrado, até a conclusão desta dissertação, pelo constante apoio e amor incondicional.

A todos aquele que de alguma maneira tornaram possível a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Milho.....	3
2.2 Transformação genética em plantas.....	6
2. 2.1 Agrobacterium tumefaciens.....	8
2.2.2 Biobalística.....	12
2.3 Estratégias moleculares para avaliação de plantas transgênicas....	13
2.4 Solos ácidos.....	17
2.5 Genética da tolerância ao alumínio em plantas.....	18
2.6 Tolerância a concentrações tóxicas de alumínio mediada pelo gene SbMATE.....	22
2.7 Avaliação da tolerância.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Construção gênica.....	26
3.2 Material vegetal.....	27
3.3 Cultura de tecidos.....	27
3.4.1 Precipitação do DNA sobre as micropartículas.....	28
3.4.2 Seleção de plantas transgênicas após o bombeamento.....	29
3.5 Transformação mediada Agrobacterium tumefaciens.....	30
3.6 Análise molecular.....	31
3.6.1 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.....	31
3.6.2 Southern blot.....	32

3.6.3 Real Time PCR.....	33
3.6.3.1 Desenhos de “primers” e sondas.....	33
3.6.3.2 Obtenção do RNA total.....	33
3.6.3.3 RT-PCR: Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase.....	33
3.7 Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva.....	34
3.8 Análises Estatísticas.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Clonagem gênica.....	39
4.2 Transformação genética de milho.....	46
4.3 Análise molecular.....	47
4.3.1 Amplificação do gene SbMATE via PCR.....	47
4.3.1.1 Plantas T0.....	48
4.3.1.2 Plantas T1.....	50
4.3.2 Análise da presença do gene SbMATE por Southern blotting...	53
4.4 Análises da expressão gênica.....	56
4.4.1.1 Crescimento radicular de genótipos de milho não transgênico em solução nutritiva com diferentes doses de Al.....	56
4.4.2 Crescimento radicular nos genótipos de milhos transgênicos em {60} µL de Al.....	59
4.4.3 Quantificação da expressão do gene SbMATE por PCR em tempo real.....	68
5 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	93

## LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Desenvolvimento do germoplasma com alto vigor e uma excelente resposta em cultura de tecido, denominado Hi II (Armstrong et al. 1991).....	6
FIGURA 2	Construção gênica <i>Ubi::SbMATE::NOS</i> utilizada para transformação genética das plantas de milho.....	39
FIGURA 3	Isolamento do promotor Ubiquitina e terminador NOS do vetor <i>pAHC17</i> (Christensen et al., 1996).....	40
FIGURA 4	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio correspondente ao isolamento do promotor da Ubiquitina e terminador <i>NOS</i> do vetor <i>pAHC17</i> .(A) Digestão total com <i>HindIII</i> e parcial com <i>EcoRI</i> do plasmídeo <i>pAHC17</i> .: (1) 1 minuto; (2) 2 minutos; (3) 3 minutos; (4) 4 minutos; (5) 5 minutos; (6) 6 minutos; (7) minutos; (8) minutos. A seta indica o fragmento de 2,2 kb correspondente ao promotor da Ubiquitina e o terminador <i>NOS</i> ; (B) Confirmação da purificação da banda isolada do gel em A, referente à <i>Ubi::NOS</i> .....	41
FIGURA 5	Vetor binário <i>pCAMBIA 3301</i> contendo a inserção do promotor e terminador <i>Ubi::NOS</i> entre os sítios de restrição <i>HindIII</i> e <i>EcoRI</i> . O <i>pCAMBIA</i> possui o gene de seleção fosfinothricin acetil transferase ( <i>bar</i> ) sobre o controle do promotor e terminador <i>CaMV35S</i> e foi utilizado para transformação mediada via biobalística.....	42
FIGURA 6	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a clonagem do cDNA do gene <i>SbMATE</i> no vetor <i>TOPO TA</i> . O gene <i>SbMATE</i> foi amplificado via	

transcrição reversa da linhagem de sorgo SC283 e clonado nos sites *EcoRI* e *BamHI* do plasmídeo *TOPO TA* gerando o plasmídeo *TOPO TA/ SbmMATE*. (A) Digestão total com *EcoRI* confirmando a presença do gene *SbmMATE* no vetor *TOPO TA*. (B) Digestão parcial com *BamHI* do plasmídeo *TOPO TA* contendo o gene *SbmMATE*; (1) 0 minuto, (2) 1 minuto, (3) 2 minutos, (4) 3 minutos, (5) 4 minutos, (6) 5 minutos. (C) Fragmento purificado, correspondente ao *SbmMATE* isolado do gel B.. 43

FIGURA 7 Posição do anelamento dos *primers* na construção *pCAMBIA 3301 / Ubi::SbmMATE::NOS*, confirmando a integridade das sequências geradas. O tracejado indica o local, e as setas indicam a posição do anelamento dos *primers*..... 44

FIGURA 8 Vetor binário *pTF101* (Paz et al., 2004) contendo o gene *SbmMATE* sob o controle do promotor *Ubiquitina* e o terminador *NOS*, gerando a construção *Ubi::SbmMATE::NOS*, entre os sítios de restrição *HindIII* e *EcoRI*, utilizado para transformação via *Agrobacterium*. O cassete contém em sua construção o gene de seleção *bar* sob o controle do promotor (P) 35S e o terminador (T) *vsp*..... 45

FIGURA 9 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (A) Digestão da construção *Ubi::SbmMATE::NOS*, total com *HindIII* e parcial com *EcoRI*, com os tempos: 0 (0 min sem *EcoRI*); 1 (1 min); 2 (2min); 3 (3min) e 4 (10 min) em ordem crescente de aplicação; (B) Banda purificada correspondente a construção *Ubi::SbmMATE::NOS* isolada

	do gel A.....	45
FIGURA 10	Posição de anelamento dos primers JL57F e JL58R no gene <i>SbMATE</i> , presente na construção gênica <i>Ubi::SbMATE::NOS</i> . Os primers geram um fragmento de 788pb do gene <i>SbMATE</i> .....	47
FIGURA 11	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR das plantas T0 transformadas via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> utilizando os primers JL57F e JL58R; (1) MM 1Kb lambda; (2,3) Milho não transgênico; (4 a 8) Eventos regenerados; (9) Eventos regenerados e negativo para o gene <i>SbMATE</i> (10) Plasmídeo <i>pCAMBIA 3301/Ubi::SbMATE::NOS</i> diluído 1:100. (11) Branco.....	49
FIGURA 12	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR das plantas T1 para o gene <i>SbMATE</i> com os primers JL57F e JL58R; Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo planta de milho não transgênica; (3, 4, 5, 7, 8, 9 10, 13, 14, 15, 17) Plantas positivas; (6, 11,12,16) Plantas negativas para a presença do gene <i>SbMATE</i> ; (18) Branco; (19) Controle positivo plasmídeo <i>Ubi::SbMATE::NOS</i> . Os eventos com a inicial A e B são referentes à transformação mediada via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e biobalística, respectivamente.....	51
FIGURA 13	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR de plantas T1 para o gene <i>bar</i> amplificado com os primers BarF e BarR; Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo; (3, 4, 5, 7, 8, 9	

- 10, 12, 13, 14, 15, 17) Plantas positivas; (6, 11, 16) Plantas negativos; (18) Branco; (20) Controle positivo plasmídeo *Ubi::bar::NOS*. Os eventos com a inicial A e B são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente..... 52
- FIGURA 14 *Southern blot* de plantas T0 transformadas via *Agrobacterium*. 30µg de DNA genômico foram digeridos com *EcoRI* e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar presença do gene. Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo planta de milho não transgênica; (3, 4, 5, 6, 7, 8) Plantas positivas; (9) Plantas negativas; (11) Plasmídeo *Ubi::SbMATE::NOS*..... 53
- FIGURA 15 *Southern blot* dos eventos T1 transformadas via *Agrobacterium* e biobalística. 30µg de DNA genômico foram digeridos com *EcoRI* e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar presença do gene. (C-) Controle negativo; (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) Evento segregado positivo gerados via transformação mediada *Agrobacterium*; (11, 12, 13, 15) Evento segregado positivo gerados via transformação mediada biobalística; (4, 9, 10, 14) Evento segregado negativo; (x) Branco; (C+) Plasmídeo *pCAMBIA 3301/Ubi::SbMATE::NOS* diluído 1:500. Os eventos com a inicial A e B são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente..... 54
- FIGURA 16 *Southern blot* dos eventos T1 transformadas via *Agrobacterium* e biobalística. 30µg de DNA genômico

foram digeridos com *Hind*III e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar o número de cópias do gene. (C-) Controle negativo; (x) branco; (1 a 8) eventos gerados via *Agrobacterium*; (9 a 15) eventos gerados via biobalística; (C+) Plasmídeo *Ubi::SbMATE::NOS* diluído 1:500. Os eventos com a inicial A e B são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente..... 55

FIGURA 17 Aspectos visuais de raízes de genótipos sensíveis (S), moderadamente tolerante (M), tolerante (T) e altamente tolerante (A) na presença {60}  $\mu$ M de alumínio..... 60

FIGURA 18 Comparação das médias das %CRR entre os eventos transgênicos obtidos via *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística e não transgênicos. L53: linhagem tropical sensível ao  $Al^{+3}$ ; Hi II híbrido temperado utilizado na transformação genética (F2); L3: linhagem tropical com tolerância mediana ao  $Al^{+3}$ ; A: parental A do híbrido Hi II; B: parental B do híbrido Hi II; Biobalística: média de 39 eventos obtidos via biobalística; *Agrobacterium*: média de oito eventos obtidos via transformação mediada por *Agrobacterium*..... 64

FIGURA 19 Expressão do transgene *Ubi::SbMATE::NOS* em plantas T0 (transformadas via *Agrobacterium*) utilizando Real Time PCR/*SyberGreen*. (A) Expressão do gene *bar*. Amostras 4, 6, 7, 8,11: plantas positivas; 1, controle negativo planta não transgênica; (B) Expressão do gene *SbMATE*. Amostras 4, 6, 7, 8: plantas positivas; 11 planta

positiva para o gene *bar* e negativa para o gene *SbMATE*;  
C-, controle negativo planta não transgênica..... 69

FIGURA 20 Expressão do gene *SbMATE* em plantas transgênicas de milho (T1). (A) Quantificação relativa do gene *SbMATE* utilizando Real Time PCR/SyberGreen. (C-) Controle negativo planta não transgênica; Eventos A4.4, B37.4, B37.23 e B59.17: plantas negativas; Eventos A1.1, A2.17, A4.13, A4.30, A14.10, A14.17, B49.18, B49.33, B59.7, B59.20: Plantas positivas. (B) Distribuição da %CRR das plantas selecionadas para análise molecular..... 72



## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>	
TABELA 1	Quantidade de sementes T1, obtidas via transformação genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (A) e Biobalística (B), que foram analisadas em solução hidropônica contendo {60} µM de Al.....	37
TABELA 2	Porcentagem de crescimento líquido relativo (CLR) de 4 genótipos de milho expostas às atividades de {27}, {39}, e {60} µM de Al em solução nutritiva.....	57
TABELA 3	Classificação da porcentagem de indivíduos dos genótipos de milho não transgênico sob o estresse de {60} µM de Al em solução hidropônica.....	58
TABELA 4	Relação da porcentagem de indivíduos T1 quanto a sua tolerância em solução nutritiva hidropônica suplementada com {60} µM de Al. A relação do número de plantas analisadas está exposta na Tabela 1.....	61
TABELA 5	Indivíduos selecionados baseados no aspecto visual da raiz e CRR%, caracterizado quanto a sua tolerância em níveis tóxicos de Al.....	64
TABELA 6	Teste de $\chi^2$ quanto à distribuição de frequência dos valores de %CRR nas progênies T1 a um modelo normal, fornecendo indício de herança mendeliana 1:3 (Sensível:Tolerante).....	67

## RESUMO

PÔSSA, Kátia Ferreira. **Superexpressão em plantas transgênicas de milho do gene *SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio em sorgo**. 2010. 108p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras\*.

A toxicidade do alumínio ( $Al^{+3}$ ) é um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento das plantas em solos ácidos os quais representam 68% ou 250 milhões de hectares do território brasileiro e, aproximadamente 50% das terras agricultáveis do planeta. Recentemente, em sorgo foi identificado e isolado pela técnica de clonagem posicional auxiliada pela genômica comparativa, um gene de maior efeito à tolerância ao alumínio, denominado *SbMATE*. Esse gene codifica para um membro de uma família de transportadores de membrana, responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo. O presente trabalho, desenvolvido na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas/MG, Brasil, tem como base a utilização desse gene para a geração de cultivares transgênicas de milho com patamares superiores de adaptação aos solos ácidos. Calos embriogênicos e embriões imaturos de milho do híbrido Hi II, foram transformados via Biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*, com o gene *SbMATE*. A construção gênica usada na transformação contém o gene *SbMATE* sob o controle do promotor da ubiquitina, e o gene *bar* direcionado pelo promotor *CaMV35S*. Células transformadas foram selecionadas em meio contendo o herbicida glufosinato de amônio. A presença dos genes *SbMATE* e *bar* foi confirmada em 80% das plantas T0 transgênicas geradas, e em 87,5% e 57,14% das plantas T1 geradas via *Agrobacterium* e biobalística, respectivamente, através de PCR e *Southern blot*. A expressão do gene *SbMATE* pode ser confirmada através da análise do crescimento radicular em solução hidropônica adicionada de {60}  $\mu M$  de Al, e PCR em tempo real.

---

\*Comitê Orientador: Andréa Almeida Carneiro – EMBRAPA (Orientadora),  
Newton Portilho Carneiro - EMBRAPA/CNPMS.

## ABSTRACT

PÔSSA, Kátia Ferreira. **Overexpression of the gene *SbMATE*, Sorghum bicolor Aluminum tolerance in transgenic maize**. 2010. 108p. Dissertation (MSc in Plant Biotechnology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras \*.

The toxicity of aluminum ( $Al^{+3}$ ) is a major limiting factor for plant growth in acid soils which represent 68% or 250 million hectares of Brazilian territory and nearly 50% of arable land on the planet. Recently, in sorghum was identified and isolated by positional cloning technique aided by comparative genomics, a gene of major effect for aluminum tolerance, called *SbMATE*. This gene encodes a member of a membrane transporter family responsible for the efflux of citrate in roots of sorghum. This work, conducted at Embrapa Maize and Sorghum in Sete Lagoas / MG, Brazil, is based on the use of this gene to generate transgenic maize cultivars with higher levels of adaptation to acid soils. Callus and immature embryos of hybrid maize Hi II, were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* and Biobalística, with the gene *SbMATE*. The gene construction used in the process containing the *SbMATE* gene under the control of the ubiquitin promoter and the *bar* gene driven by *CaMV35S* promoter. Transformed cells were selected in media containing the herbicide ammonium glufosinate. The presence of the *SbMATE* and *bar* genes was confirmed in 80% of the T0 transgenic plants generated, and in 87.5% and 57.14% of T1 plants generated via biolistic and *Agrobacterium*, respectively, by PCR and Southern blot. *SbMATE* gene expression could be confirmed through the analysis of root growth in hydroponic solution supplemented with {60}  $\mu M$  Al, and real-time PCR.

---

\*Guidance Committee: Andréa Almeida Carneiro - EMBRAPA (Advisor),  
Newton Portilho Carneiro - EMBRAPA/CNPMS.

## 1 INTRODUÇÃO

O milho (em grão) é um dos produtos agrícolas de maior abrangência nacional, sendo cultivado em 5.319 municípios brasileiros (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2006). No Brasil, a produção do milho em 2009 foi de 51,3 milhões de toneladas, o que representa 36,4% da produção total de grãos (IBGE, 2009). Entretanto, a demanda pelo produto tem crescido mais do que a oferta, tanto no Brasil quanto no mercado internacional. Tornar o milho brasileiro competitivo no mercado internacional, aumentando a produtividade e reduzindo o impacto do aumento dos custos de produção é o grande desafio da atualidade.

A produtividade do milho é afetada por diferentes tipos de estresses bióticos (pragas e doenças) e abióticos (estresse mineral e ambiental). Dentre os estresses abióticos que interferem com a produção de grãos, encontra-se a presença de alumínio nos solos ácidos. Aproximadamente 20% da produção mundial de milho é afetada negativamente em solos ácidos contendo concentrações tóxicas de alumínio. O alumínio trivalente ( $Al^{+3}$ ) em concentrações tóxicas nos solos é um fator limitante para a produção vegetal devido à inibição do crescimento radicular, com consequente diminuição da capacidade das plantas em absorver água e nutrientes (Ueküll et al., 1995; Delhaize et al., 2009).

No Brasil o alumínio limita a produção de grãos nas regiões cobertas por vegetação de cerrado, concentradas nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Tocantins e Piauí, cerca de um quarto do território nacional (Ferreira et al., 2006).

A acidez do solo pode ser corrigida através da calagem, que é a aplicação de calcário ( $CaCO_3 + MgCO_3$ ) nas áreas agrícolas, porém muitas vezes essa não é a melhor opção, pois não é economicamente viável para

produtores de baixa renda, além de corrigir apenas as camadas superficiais, não corrigindo a acidez do subsolo.

Em adição à correção do solo ácido pela calagem, o melhoramento convencional de plantas, vem desenvolvendo com sucesso genótipos de milho que toleram uma maior concentração de Al no solo (Hartwig, et al., 2007). Enquanto os programas convencionais de genética continuam exercendo um papel fundamental na melhoria dessas características agrônômicas do milho, tecnologias recentes, geradas em função dos enormes progressos alcançados pela biologia molecular e celular nos últimos anos, permitem que novas ferramentas sejam agregadas aos programas de melhoramento convencional para a criação e desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes ao  $Al^{+3}$ .

Por meio de técnicas de biologia molecular genes passíveis de serem utilizados para aumentar a tolerância do milho ao  $Al^{+3}$ , têm sido isolados e caracterizados (Sasaki et al., 2004; Furukawa et al., 2007; Magalhães et al., 2007; Wang et al., 2007). Magalhães et al. (2007) isolaram e caracterizaram de sorgo um gene maior envolvido na tolerância ao  $Al^{+3}$ , o gene *SbMATE*, pertencente à família multigênica MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion family*). Sua proteína *Alt<sub>Sb</sub>*, confere tolerância ao  $Al^{+3}$  devido ao efluxo de citrato, em presença de  $Al^{+3}$ .

A superexpressão do gene *SbMATE* em *Arabidopsis thaliana* gerou indivíduos mais tolerantes ao estresse de Al (Magalhães et al., 2007). Esses resultados prévios permitiram a proposição da presente pesquisa que visou aplicar o conhecimento gerado, na produção de plantas de milho superexpressando o gene *SbMATE*. Genótipos de milho mais tolerantes ao Al que os atuais poderão ser integrados aos programas de melhoramento genético de milho podendo aumentar a sua produtividade em regiões onde solos ácidos são predominantes como, por exemplo, o cerrado brasileiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Milho

Evidências arqueológicas indicam que a domesticação do milho ocorreu entre 5000 e 10000 anos atrás (Smith, 1995), sendo que há aproximadamente 9000 anos, no Sul do México, surgiu o milho moderno, derivado do *Zea mays* ssp. *parviglumis*, conhecido como teosinte (Doebley, 2004). O milho é uma monocotiledônea pertencente à família das Gramíneas (Poaceae), do gênero *Zea*. A espécie economicamente importante, que foi domesticada pelo homem é conhecida como *Zea mays* ssp. *mays* L.

O milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. O Brasil é o quarto maior produtor mundial, com mais de 50 milhões de toneladas na safra de 2008/2009 (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2009). Ele é produzido em quase todos os continentes do mundo, e utilizado desde a alimentação humana e animal até a produção de filmes, embalagens biodegradáveis e biocombustível. Em geral, apenas 15% da produção mundial é destinada ao consumo humano, de forma direta ou indireta (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 2006).

Desde o início da agricultura nas Américas, o milho vem sofrendo várias pressões seletivas do homem, resultando num aumento da produtividade e alterações na planta. Com a descoberta dos conhecimentos de genética por Mendel, surgiu a fase do melhoramento clássico do milho, a qual vem exercendo um papel fundamental na melhoria de suas características agronômicas (Paterniani, 1987). No Brasil, a produtividade do milho, nas últimas três décadas, aumentou mais de 200%, sendo que a área utilizada para o plantio cresceu apenas 18% (CONAB, 2009). Esses resultados foram devidos, em grande parte, aos rigorosos programas de seleção e melhoramento de cultivares.

Atualmente, a biotecnologia está sendo utilizada como uma ferramenta para auxiliar o melhoramento do milho. Através de estudos moleculares, um grande número de genes, passíveis de serem utilizados para a melhoria genética do milho, estão sendo isolados e caracterizados, e as técnicas de transformação genética de plantas poderão ser empregadas para alterar a funcionalidade *in vivo* desses genes e produzir cultivares com características agrônomicas e nutricionais superiores.

A partir de 1975, quando Green e Phillips desenvolveram com sucesso o primeiro trabalho de regeneração de plantas de milho *in vitro*, ampliou-se consideravelmente a possibilidade de utilização de novos genes para a produção de cultivares melhoradas via técnicas de biologia molecular ou transferência genética de genes, pois o estabelecimento de sistemas de regeneração de plantas a partir de células somáticas, constitui-se em um pré-requisito de fundamental importância nesse processo.

A regeneração de plantas de milho descrita pela primeira vez em 1975 por Green & Phillips, foi realizada utilizando embriões somáticos imaturos como explantes. Para a indução dos calos, os embriões eram coletados 10 a 15 dias após a fecundação das sementes, com aproximadamente 1,0 a 2,0 mm de comprimento e cultivados com os eixos embrionários em contato com o meio. Essa orientação retarda a germinação do embrião e induz a proliferação de células do escutelo, as quais formam o calo (Green & Phillips, 1975). Esse posicionamento dos embriões no meio de cultivo é o método mais comum para a regeneração de plantas em gramíneas (Vasil, 1987; Phillips et al., 1988; Wang & Frame, 2004).

Em 1982, Green descreveu a regeneração de plantas de milho a partir de calos embriogênicos friáveis que eram diferentes fenotipicamente dos calos descritos anteriormente. Esse calo tem um crescimento rápido, facilmente disperso e consiste de muitos embriões somáticos pequenos. Em seguida,

Armstrong & Green (1985) introduziram os termos calos do Tipo I e II que são utilizados atualmente para a classificação das culturas embriogênicas de milho. Os calos do Tipo I são compostos de dois tecidos distintos: um tecido é duro, compacto, amarelo ou branco e normalmente capaz de regenerar plantas; o outro tecido é granular, amarelo pálido ou cinza claro, translúcido e incapaz de regenerar plantas (Vasil & Vasil, 1981). Os calos descritos como do Tipo II são macios, friáveis e altamente embriogênicos (Armstrong & Green, 1985; Tomes & Smith, 1985). As culturas formadoras de calos do Tipo II crescem rapidamente, podem ser mantidas por um longo período de tempo e formam um grande número de embriões somáticos facilmente regeneráveis (Vasil, 1987).

Embora calos do Tipo II sejam os mais eficientes na produção de plantas transgênicas de milho, calos do Tipo I podem também ser utilizados. A ocorrência de calos embriogênicos friáveis do Tipo II não é tão comum, apenas um número limitado de genótipos de milho é capaz de expressar esse fenótipo em meio de cultivo, notadamente a linhagem A188 (Armstrong & Green, 1985) e o híbrido Hi II (Armstrong et al., 1991).

Armstrong et al. (1991) desenvolveram um germoplasma com alto vigor e uma excelente resposta em cultura de tecido. O híbrido Hi II resultou do cruzamento entre as linhas endogâmicas A188 e B73 (Figura 1). Ambas as linhagens endogâmicas estão disponíveis publicamente e foram desenvolvidas pelas Universidades de Minesota e do Estado de Iowa, respectivamente.



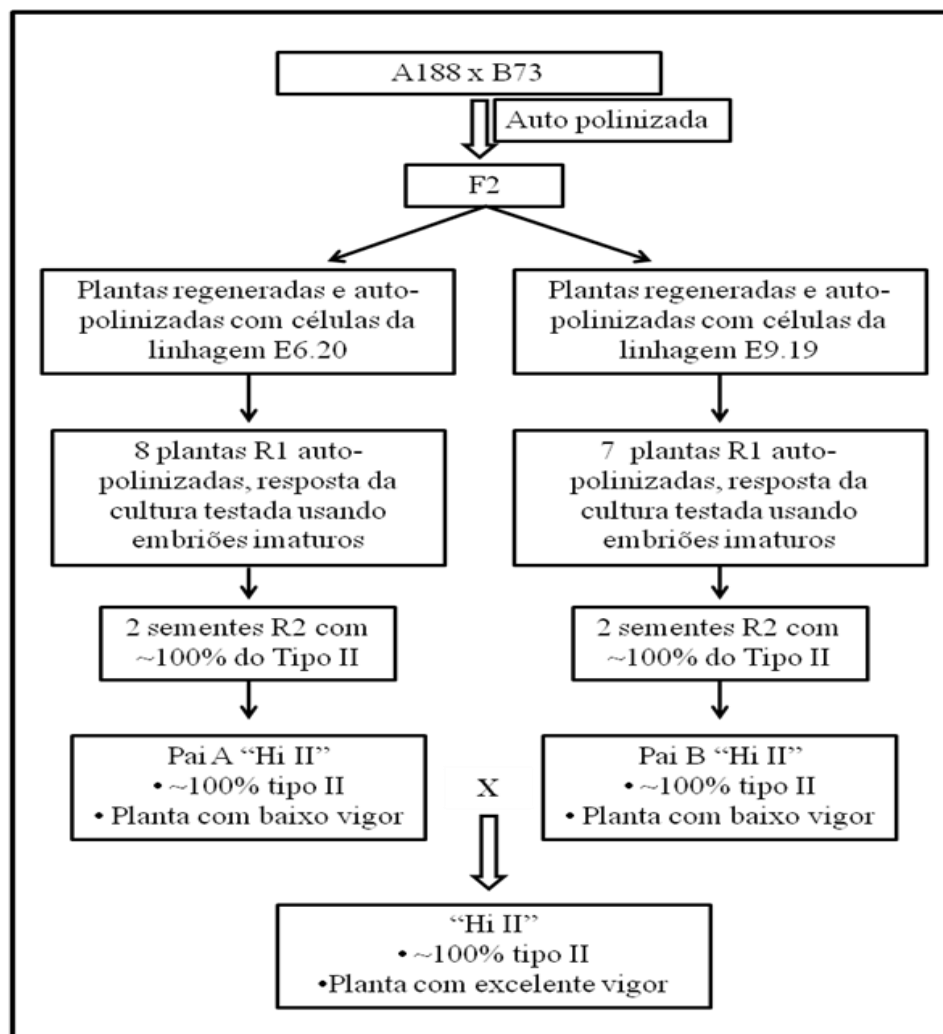


FIGURA 1 Desenvolvimento do germoplasma com alto vigor e uma excelente resposta em cultura de tecido, denominado Hi II (Armstrong et al., 1991).

## 2.2 Transformação genética em plantas

Durante mais de 10000 anos, o homem vem constantemente procurando melhorar as características de suas culturas: melhor rendimento, qualidade nutricional, tolerância e resistências aos efeitos bióticos e abióticos, enfim,

características que auxiliam no cultivo e colheita. Atualmente, os programas de melhoramento são cada vez mais sofisticados, porém ainda retém o elemento acaso, e dependem desse fator para que ocorra uma união satisfatória das características parentais e seja produzido um descendente com as características desejadas, sendo esse um processo longo e difícil (Brown, 2003).

A geração das primeiras plantas transgênicas ocorreu no início da década de 1980 (Davery et al., 1980; Fraley et al., 1983; Zambryski et al., 1983), e durante os últimos anos, vem provocando inúmeros e significativos impactos em diferentes culturas. O maior fator desse crescimento é principalmente a vantagem do gerenciamento agrícola, que reduz a aplicação de defensivos e outros fatores que contribuem para uma agricultura mais estável (Mir et al., 2004).

As plantas podem ser geneticamente modificadas, basicamente por dois motivos (i) para a melhoria de suas características agrônômicas e qualidades nutricionais (Aragão et al., 2000; Aragão et al., 1998; Aragão et al., 1999; Rech et al., 1991) e, (ii) para serem utilizadas como reatores biológicos para a produção de biomoléculas (Leite et al., 2000).

A transformação genética das plantas permite a transferência de genes de uma espécie para outra aumentando a amplitude do *pool* de genes geralmente disponíveis em sistemas produtivos convencionais. É muito importante nas culturas perenes e nas espécies de plantas em que o desenvolvimento de novos cultivares é difícil devido ao longo tempo de geração (Ribas et al., 2006).

Através da transformação genética, um gene isolado e caracterizado pode ser introduzido em programas de melhoramento genético de plantas (Torres et al., 1999).

Existem duas estratégias para a transformação de plantas: indireta e direta. A estratégia indireta é aquela que utiliza um vetor como a *Agrobacterium tumefaciens* ou *A. rhizogenes* como veículo de entrega do DNA à planta.

Métodos químicos e físicos possibilitam a transformação direta de genomas. Dentre eles destacam-se: a biobalística (ou aceleração de micropartículas), a eletroporação, e a utilização de polietilenoglicol (PEG).

A transformação genética em plantas é uma estratégia eficiente que pode ser acoplada ao melhoramento clássico de cultivares para a produção de culturas economicamente importantes e melhor adaptadas aos solos ácidos (Foy, 1984).

### **2.2.1 *Agrobacterium tumefaciens***

Por mais de duas décadas, cientistas têm usado a transformação genética mediada por *Agrobacterium* para gerar plantas transgênicas (Lee et al., 2008). Esse método de transferência gênica foi desenvolvido a partir de estudos de uma doença conhecida como galha-da-coroa (*crown gall*), causada por *Agrobacterium* em plantas. O aparecimento de um tumor ou galha em um tecido vegetal infectado ou ferido é o indício da manifestação dessa doença. Esse tumor é formado por células que se proliferam incontroladamente, podendo até matar a planta (Torres, 1999). É interessante observar que a aparição dessas galhas, é resultado de um processo natural de transferência dos genes entre a agrobactéria e a célula vegetal, semelhante à conjugação bacteriana.

Um fragmento de DNA plasmidial, chamado T-DNA (*transferred DNA*), é transferido para a célula vegetal e integrado ao seu genoma. A formação de tumores é uma manifestação fenotípica da expressão dos genes presentes no T-DNA. O T-DNA corresponde a um segmento, em *A. tumefaciens*, de um plasmídeo denominado Ti (*tumor-inducing*), e é delimitado por sequências repetidas de 25 pb, conhecidas como borda direita (RB – *Right Border*) e borda esquerda (LB – *Left Border*) (Gelvin, 2003; Mir et al., 2004).

Durante a transferência do T-DNA para a planta, genes presentes no cromossomo bacteriano (*chv*) e no plasmídeo Ti (*vir*) são necessários (Tzfira et al., 2002; Gelvin, 2003). O conjunto de genes localizados no cromossomo

circular bacteriano está envolvido na adesão da *A. tumefaciens* à planta infectada, dentre eles incluem, *chvA*, *chvB*, *pscA*, *attA-Z* e *celABCDE* (Matthysse et al., 2000; Ziemienowicz, 2001). Apesar de não ser totalmente conhecida a função de todos esses genes, é sabido que um grande número deles auxilia a ligação da bactéria às células hospedeiras (Matthysse et al., 2000).

A região *Vir* está localizada no plasmídeo-Ti da *Agrobacterium*, e codifica muitas proteínas de virulência bacteriana (*Vir*) usadas pela bactéria para produzir e transportar para a célula vegetal uma cópia do T-DNA (Tzfira et al., 2006).

Resumidamente, o processo de transformação inicia-se com a ligação da *Agrobacterium* à célula da planta, seguida de indução da expressão da região *vir* devido a sinais específicos emitidos pela planta hospedeira, tais como monossacarídeos e compostos fenólicos. Como resultado da ativação dos genes *Vir*, uma fita simples da molécula de T-DNA é produzida pela ação combinada das proteínas *VirD1* e proteínas *VirD2*. O complexo, juntamente com várias outras proteínas *Vir*, é exportado para a célula hospedeira da planta por um sistema de secreção tipo IV formado pelas proteínas *VirB/D4*. Uma vez dentro do hospedeiro no citoplasma das células, o T-DNA é revestido com numerosas moléculas *VirE2*, que conferem ao T-DNA proteção necessária para a sua viagem até o núcleo da célula vegetal. O T-DNA é transportado até o núcleo e integrado ao genoma da planta, com o auxílio de proteínas produzidas pelo hospedeiro (Gelvin, 2003; Tzfira et al., 2006).

Para viabilizar a utilização da *Agrobacterium* em processos biotecnológicos de transferência de genes para plantas é necessário que os genes endógenos do T-DNA causadores de tumor sejam inativados e, que os genes exógenos sejam inseridos entre as extremidades direita e esquerda do T-DNA. O plasmídeo recombinante resultante é novamente colocado na *Agrobacterium* para ser transferido para células vegetais (Gelvin, 2003). Tecidos ou células

transformados podem ser utilizados para regeneração de plantas transgênicas (Schafer et al., 1987; Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996).

Por ser muito grande, o plasmídeo Ti é difícil de ser manipulado, portanto foram criados os vetores binários (Bevan, 1984), os quais são menores e capazes de multiplicar tanto em *Agrobacterium* como em *E. coli* e fáceis de manipular em laboratório. Esses vetores possuem um T-DNA artificial, no qual diferentes transgenes podem ser inseridos e uma origem de replicação compatível com o Ti na *Agrobacterium*. Os vetores binários são introduzidos em *Agrobacterium* desarmadas, ou seja, em *Agrobacterium* que carregam plasmídeos Ti que tiveram a região do T-DNA removida. O Ti de *Agrobacterium* desarmadas ainda possui a região de virulência (*vir*), sendo seus genes capazes de agir *in trans* para transferir o T-DNA recombinante do vetor binário (Gelvin, 2003).

Durante a transformação, é necessário que a bactéria permaneça em contato com o tecido vegetal. Essa interação inicial envolve uma série de sinalizadores químicos que possibilitam a comunicação entre o patógeno e a planta hospedeira (Winans, 1992; Hooykaas et al., 1994; Baker et al., 1997). Além disso, para que a bactéria infecte a planta é necessário que haja um ferimento no tecido vegetal. Sabe-se que as células feridas, e metabolicamente ativas, exsudam compostos fenólicos de baixo peso molecular, que são reconhecidos pela bactéria no momento da infecção. Tais moléculas são identificadas como acetosiringona (AS) ou  $\alpha$ -hidroxi-acetosiringona (OH-AS), chalconas e derivados do ácido cinâmico (Stachel et al., 1985) e são responsáveis pela iniciação da transferência do T-DNA (Brasileiro, 1998).

Após a transferência do T-DNA para o tecido vegetal, esse é cultivado inicialmente em meio nutritivo contendo antibiótico para a eliminação da bactéria. Os tecidos que foram transformadas são regenerados *in vitro* na

presença do agente de seleção e, as plantas geradas são aclimadas em casa de vegetação (Brasileiro, 1998).

A transformação mediada *Agrobacterium tumefaciens* é o método preferido para a transformação genética porque tem uma alta eficiência com baixo número de cópias do transgene (Zhao et al., 1998).

Durante muito tempo, a transformação via agrobactérias em monocotiledôneas, foi considerada inacessível, porém várias espécies de interesse econômico como arroz, cevada, milho, trigo, aspargo, cana-de-açúcar, banana e tulipas, entre outras, já puderam ser transformadas geneticamente por esse método, devido a estudos de otimização da metodologia (Mir et al., 2004).

*Agrobacterium tumefaciens* constitui um excelente sistema de introdução de genes em células vegetais uma vez que: (i) o DNA pode ser introduzido em todos os tecidos da planta, o que elimina a necessidade de se produzir protoplastos; (ii) a integração do T-DNA é um processo relativamente preciso. A região de DNA a ser transferida está definida pelas sequências flanqueadoras. Ocasionalmente se produz reordenações, mas na maioria das vezes a região é inserida intacta no genoma da planta. A estabilidade de expressão da maioria dos genes que se introduz via *Agrobacterium tumefaciens* é excelente (Offringa et al., 1992). Normalmente, os T-DNA integrados mostram mapas genéticos consistentes e segregação adequados. Ademais, os caracteres introduzidos por esta via têm se mostrado estáveis durante muitas gerações de cruzamentos. Essa estabilidade é crítica quando se pretende comercializar as plantas transgênicas geradas (Hiei et al., 1994; Ishida et al., 1996).

Essa metodologia tem sido usada para a transformação de tecidos de culturas de milho amenas como o híbrido Hi II (Zhao et al., 2001; Frame et al., 2002), embriões zigóticos imaturos de linhagens A188 e H99 (Ishida et al., 1996, 2003; Negrotto et al., 2000), e até mesmo algumas linhagens patenteadas

(Gordon-Kamm et al., 2002) ou públicas (Ishida et al., 2003; Huang et al., 2005).

### **2.2.2 Biobalística**

Outra metodologia de transformação bastante utilizada com sucesso é a biobalística, também conhecida por aceleração ou bombardeamento de partículas, biolística, *particle gun* ou *gene gun*. É um método amplamente utilizado por ser capaz de superar as restrições estabelecidas por algumas necessidades de compatibilidade hospedeiro-*Agrobacterim* (Mir et al., 2004).

Apesar de existir diferentes metodologias/aparelhos para obter a transformação genética por biobalística, o princípio é o mesmo. É baseado na aceleração em altas velocidades de micropartículas, de ouro ou tungstênio, que atravessam a parede celular, a membrana plasmática e membranas de organelas, de forma não letal, alojando-se aleatoriamente nos diversos compartimentos celulares (Klein et al., 1987; Sanford, 1988).

O uso do bombardeamento de partículas é bastante amplo e de fácil adaptação, podendo ser aplicado em diversos tecidos e células, incluindo suspensões (Klein et al., 1989; Fromm et al., 1990), embriões imaturos (Southgate et al., 1998), embriões somáticos (Finer et al., 1991; Santarém et al., 1997), calos (Vasil et al., 1985), e tecidos meristemáticos (McCabe et al., 1993). Essa metodologia pode ser essencialmente idêntica, independentemente do tecido vegetal e do DNA a ser inserido (Santarém, 2000). Porém, a transformação genética via biobalística apresenta algumas desvantagens, entre elas a inserção de múltiplas cópias do transgene, o que pode ocasionar o silenciamento gênico e a instabilidade de expressão (Hansen et al., 1996).

É importante levar em consideração alguns fatores que afetam a frequência de transformação por esse método, como: o tamanho, o número e a composição das partículas. O método de precipitação do DNA sobre as

partículas antes do bombardeamento, a velocidade de impacto do complexo DNA-partículas, a distância de migração das partículas e o dano causado ao tecido alvo, também podem influenciar no resultado esperado da transformação, por isso devem ser feitos testes e adaptações em diversas condições e determinar as melhores para um determinado tecido-alvo e genótipo vegetal (Mir et al., 2004).

A produção de milho transgênico através da biobalística tornou-se rotina desde os relatos de Gordon-Kamm et al. (1990). A estratégia descrita por Gordon-Kamm et al. (1990) envolveu três componentes principais: a) culturas de calos embriogênicos em suspensão; b) introdução de DNA via bombardeamento com partículas metálicas cobertas com DNA; e c) um sistema de seleção baseado em marcadores dominantes. A cultura de células em suspensão foi iniciada de calos embriogênicos friáveis do Tipo II e o bombardeamento com microprojéteis foi calibrado de maneira a introduzir partículas com dano mínimo em um grande número de células (Gordon-Kamm et al., 1990).

Essa tecnologia tem sido utilizada para transformar vários tecidos de milho (Gordon-Kamm et al., 1990), incluindo embriões zigóticos imaturos de diferentes linhagens (Koziel et al., 1993; Dunder et al., 1995; Brettschneider et al., 1997; Frame et al., 2006; Petrillo et al., 2008) e o híbrido Hi II (Songstad et al., 1996; Pareddy et al., 1997).

### **2.3 Estratégias moleculares para avaliação de plantas transgênicas**

A primeira etapa da avaliação de plantas transgênicas requer o detalhamento da modificação genética e os principais parâmetros a serem avaliados são: o tamanho do material genético inserido, o número de genes inserido, a identificação das sequências marcadoras do material genético construído para inserção que permitem sua detecção (genes marcadores) e



expressão (promotor) e a localização da inserção (The Institute of Food Technologists - IFT, 2000b).

A reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), o Southern blot e o Real Time-PCR são técnicas bastante utilizadas para a detecção de modificações genéticas em plantas.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma amplificação de uma região selecionada numa molécula de DNA. A sequência dessa região deve ser conhecida para ser selecionada, pois dois pequenos oligonucleotídeos devem hibridizar com a molécula de DNA, um oligonucleotídeo para cada uma das fitas da hélice dupla. Esses oligonucleotídeos atuam como iniciadores da reação e delimitam a região que será amplificada (Brown, 2003).

O princípio da PCR está de acordo com o princípio natural de replicação do DNA. O processo acontece em três passos, que em conjunto formam um ciclo que se repete um número específico de vezes. O ciclo consiste nos seguintes passos: *desnaturação*, onde a temperatura é elevada geralmente acima de 90°C, quebrando as ligações de hidrogênio e separando a dupla fita de DNA; *hidridização* ou *anelamento*, entre 40°C e 65°C, dependendo do comprimento dos primers e da sua sequência, esses marcam as extremidades da sequência alvo; *extensão*, a qual ocorre em temperaturas aproximada à 72°C, é quando a enzima *Taq* polimerase começa a replicar a cadeia de DNA. A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. Assim termina um ciclo, e ao final de cada ciclo encontramos duas novas cadeias de DNA idênticas à original, que servirá de molde para o próximo ciclo até o término dos ciclos, haverá uma cadeia de DNA com um comprimento definido, com os limites definidos pelos *primers*, e estará presente num número muito maior do que as sequências de comprimento variável (Roche, 2010). Essa técnica é utilizada para detectar as sequências de

DNA geneticamente modificadas, porém não é suficiente devido aos falsos positivos que podem aparecer na reação.

O método de *Southern blot* serve para detectar a presença e o número de cópias de uma determinada sequência de DNA na amostra analisada.

Em 1975, E. M. Southern aperfeiçoou uma técnica de transferência das bandas de DNA de um gel de agarose para uma membrana e referiu-se como transferência de *Southern* (ou *Southern-blotting*). A membrana é colocada sobre o gel e um tampão sendo forçada a passar através do mesmo, carregando o DNA do gel para a membrana, na qual o DNA é ligado. A transferência de Southern é uma membrana que contém a réplica das bandas do DNA do gel de agarose corrido em uma eletroforese. Se a sonda marcada for replicada, a hibridização ocorre e uma auto-radiografia (ou algo equivalente) revela qual fragmento de restrição contém o gene clonado. Sendo assim, pode ser utilizado para localizar a posição de um gene clonado, ou um isolado por meio de PCR, dentro de uma molécula de DNA qualquer, da qual um mapa de restrição foi obtido (Brown, 2003).

O Real Time-PCR (RT-PCR) ou QPCR (PCR quantitativo) é um dos métodos que quantifica a expressão gênica através da transcrição reversa juntamente com a reação em cadeia da polimerase (Murphy et al., 1990; Horikoshi et al., 1992). Durante a reação, a inserção de uma sonda especial de DNA permite a detecção de fluorescência. No ensaio TaqMan™, essa sonda contém uma molécula *repórter* (de emissão), e uma molécula *quencher* (de extinção). Quando a molécula *repórter* e a *quencher* estão próximas fisicamente, a emissão de fluorescência é anulada, portanto, nenhum sinal pode ser detectado. Durante a amplificação a sonda é degradada, afastando o *repórter* do *quencher*, resultando na emissão do sinal fluorescente, que é captado por uma câmera digital. O ensaio descrito acima é o mais utilizado (Weighardt et al., 2004),

porém existem outros ensaios utilizados para estimar a concentração de produto amplificado na RT-PCR, que podem ser encontrados na literatura.

A sonda SYBER Green é sonda que fornece um formato mais simples e mais econômico para detecção e quantificação de produtos em RT-PCR. A sonda SYBER Green liga-se ao DNA dupla-fita, e sobre a excitação emite luz. Assim como um produto de PCR acumula aumentos, o RT-PCR acumula fluorescência. É uma sonda barata, fácil de usar, e sensível. A desvantagem é que SYBER Green vincula a qualquer dupla fita de DNA na reação, incluindo primer-dímeros e outros produtos de reação não específica, o que resulta em uma superestimação da concentração alvo. Para reações de um único produto de PCR com primers bem concebidos, a sonda SYBER Green pode funcionar muito bem (Applied Biosystems, 2010).

Um dos requisitos importantes na técnica de RT-PCR é a escolha de um gene candidato a controle endógeno, sua presença constante em todas as amostras testadas deve ter pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Por esse raciocínio, as possíveis variações de pipetagem e conseqüentemente a concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou PCR seriam corrigidas pela expressão do gene constitutivo (Applied Biosystems, 2004).

O percentual de organismos geneticamente modificados (OGMs) na planta é obtido comparando-se a curva da amostra analisada com uma curva de calibração padrão (Weighardt et al., 2004). Essa técnica é altamente sensível, precisa, segura, rápida e capaz de detectar uma ampla série de eventos geneticamente modificados, além de o produto ser analisado diretamente, reduzindo, significativamente, o risco de contaminação (Brodmann et al., 2002, Holst-Jensen et al., 2003; Miraglia et al., 2004).

## 2.4 Solos ácidos

O alumínio (Al) é o metal mais abundante encontrado na terra, calcula-se que mais de 50% dos solos com grande potencial de cultivo no mundo tem um pH baixo (< 5,0), sendo o Al o principal elemento responsável pela toxicidade e pela baixa fertilidade desses solos (Uesküll et al., 1995). Sua presença no solo pode rapidamente inibir o crescimento de raízes tornando-as incapazes de explorar um maior volume ou camadas mais profundas do solo, de tal modo que a toxidez causada pelo Al está associada às deficiências na absorção de água e nutrientes, principalmente o fósforo (Foy et al., 1978; Echart et al., 2001). O fósforo fixa-se com o Al e óxidos de Fe na superfície da argila mineral, assim sua disponibilidade no solo fica limitante para a produção vegetal em solos ácidos (Sanchez et al., 1997), o que inclui a baixa proliferação de raízes, incluindo a sua ramificação, o aumento de pêlos radiculares, e sua associação com fungos micorrízicos arbusculares destinadas a explorar um volume mais extenso do solo para P, realocação de recursos de C para a raiz, mudanças na química de raízes destinadas a aumentar a disponibilidade de P, diminuindo também a regulação de transporte de fostato (Raghothama, 1999).

O impacto do estresse do alumínio no desenvolvimento das raízes das plantas pode ser dividido em duas fases: a imediata inibição das células de alongação das raízes, que ocorre com 30-60 minutos depois da exposição (Horst, 1995), e a redução da proliferação celular nas raízes que ocorre horas ou dias depois do contato com o alumínio (Doncheva et al., 2005).

A toxicidade do alumínio e sua solubilidade são influenciadas por alguns fatores, tais como o pH, o tipo de argila que predomina no solo e o princípio da sua matéria orgânica (Foy, 1974; Silva, 1997). O Al pode ser encontrado em diferentes formas no solo, o que dificulta os estudos das suas interações com as raízes das plantas. A espécie de Al trivalente,  $Al^{3+}$ , é a que mais predomina em condições de solos ácidos (pH<5,0), pois o Al se hidrolisa em solução (Echart,

2001), porém outras espécies podem ser formadas quando o pH do solo é aumentado ou quando é neutralizado. Concentrações tóxicas de alumínio em solos ácidos limitam em mais de 30% sua capacidade de produção, podendo ser uma séria ameaça para o cultivo de alimentos no mundo (Uesküll et al., 1995).

Dentre os principais efeitos identificados nas raízes devido à presença do alumínio no solo estão à inibição da absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e a redução no efluxo de  $\text{K}^+$ , a formação de calose, a exudação de ácidos orgânicos, e outros (Rengel, 1996). A toxidez de alumínio não é facilmente identificável em plantas, pois os sintomas foliares são parecidos com aqueles relacionados à deficiência de fósforo, ou deficiência de cálcio (Furlani, 1989). Já em raízes, os sintomas da toxidez são a formação de estruturas curtas, grossas e quebradiças, com poucas ramificações finas e, portanto incapazes de absorver água e nutrientes eficientemente do subsolo (Foy, 1976; Kochian, 1995).

A dificuldade para a neutralização de íons  $\text{H}^+$  e  $\text{Al}^{3+}$  é um dos problemas encontrados nos solos ácidos, que pode ser corrigido ou minimizado por intermédio de calagem. Aplica-se calcário ( $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$ ) na superfície do solo para elevar o seu pH. A camada arável torna-se menos solúvel ao alumínio, reduzindo relativamente sua toxicidade (Marion et al., 1976). Porém é uma prática cara, e às vezes não realizada (Pandey et al., 1994; Zeigler et al., 1995), a calagem, também, pode não ser o suficiente para solucionar tal problema, pois esse procedimento não atinge as camadas inferiores e para ser realizado em grandes profundidades existem limitações técnicas e econômicas que ainda precisam ser solucionadas.

## **2.5 Genética da tolerância ao alumínio em plantas**

Algumas cultivares economicamente importantes, como trigo, milho, feijão e soja, têm mostrado uma variação interespecífica quanto à tolerância ao

$Al^{+3}$ , sendo uma fonte de exploração para aumentar a tolerância de outras linhagens também comerciais (Ryan et al., 2001).

Muitas plantas que vivem em solos ácidos têm desenvolvido uma tolerância ao Al, através do mecanismo de desintoxicação apoplástica ou simplástica. No mecanismo apoplástico, proteínas da parede celular se ligam ao Al, impedindo a transferência do Al para o simplástico, através de secreções da raiz que eleva o pH próximo do solo, tendo uma menor disponibilidade de Al (Kochian et al., 2004; Ma et al., 2001). Algumas espécies tolerantes ao Al no simplasto, muitas vezes armazenam formas menos tóxicas, complexadas com ácidos orgânicos (Ma et al., 2001).

Nos últimos anos, foram feitos progressos significativos na compreensão do mecanismo molecular da toxicidade e tolerância ao Al em plantas (Matsumoto, 2000; Collins, 2008). Os mecanismos moleculares da tolerância ao Al em plantas identificadas como exclusão até agora são denominadas como externas e internas de tolerância. (Wang et al., 2009). A exclusão externa envolve a ativação de transportadores de membrana que facilitam a exudação de ácidos orgânicos no ápice de raízes (Kochian et al., 2004), o local da fitotoxicidade de alumínio (Ryan et al., 1993). Esses ácidos orgânicos formam complexos estáveis, não-tóxicos com  $Al^{+3}$  na rizosfera (Ma et al., 2001). O mecanismo de tolerância na exclusão interna é baseado na desintoxicação do Al no simplástico via complexação com ligantes orgânicos, principalmente de novos ácidos orgânicos (Kochian et al., 2004). Existe também um mecanismo que parece ser generalizado em monocotiledôneas e dicotiledôneas, onde um ânion orgânico (malato, citrato e oxalato) secretado pelas raízes quelam e desintoxicam o  $Al^{+3}$  (Matsumoto, 2000; Ma et al., 2001; Ryan et al., 2001; Kochian et al., 2004).

O potencial de desenvolvimento de cultivares mais tolerantes aos solos ácidos tem sido recentemente, aumentada pelo isolamento de genes responsáveis

pela resistência natural do  $Al^{+3}$  em algumas espécies (Sasaki et al., 2004; Furukawa et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Wang et al., 2007), e a sua superexpressão em plantas (Ezaki et al., 2000; Basu et al., 2001; Tesfaye et al., 2001; Ryan et al., 2007).

Duas famílias de genes responsáveis pela variação natural da resistência ao  $Al^{+3}$  em várias espécies de plantas têm sido estudadas. Tais famílias codificam proteínas que são ativadas na presença de  $Al^{+3}$ , resultando no efluxo de ânions orgânicos a partir de raízes (Delhaize et al., 2007). O primeiro gene que confere tolerância ao Al, *ALMT1*, foi isolado e caracterizado por Sasaki et al. (2004) em plantas de trigo. Posteriormente, esse gene foi também identificado em centeio e *Arabidopsis* (Collins, 2008; Sasaki, 2004; Hoekenga, 2006). O gene *ALMT1* confere tolerância ao Al, através de um aumento da exudação de malato, um agente quelante do Al, pelas raízes (Sasaki, 2004; Furukawa, 2007).

Delhaize et al. (1993a, 1993b) estudaram em trigo, um fenômeno que minimiza os efeitos nocivos do Al. Usaram linhagens isogênicas que eram diferentes quanto à tolerância ao Al em um único locus dominante designado com *Alt1*. Esse locus é responsável pela ativação do efluxo de malato em ápices radiculares na presença de Al. Sasaki et al. (2004), isolaram e caracterizaram o gene mais expresso no ápice radicular das linhagens isogênicas de trigo ET8 (Al-tolerante) e ES8 (Al-sensível), usando a técnica de hibridização subtrativa. O gene foi nomeado *ALMT1*, por ter como função o efluxo de malato em presença de Al. Esse gene codifica uma proteína de membrana, que é expressa ao ser ativada em presença de Al, no ápice das raízes da linhagem ET8, em níveis muito superiores aos expressos nos ápices das raízes da linhagem ES8.

Outro gene que confere tolerância ao alumínio a linhagens de sorgo é o *MATE* que faz parte de uma família multigênica caracterizada pelo efluxo de pequenas moléculas orgânicas. Na presença de alumínio, linhagens tolerantes de

sorgo exudam uma maior concentração de citrato devido à ativação do gene *MATE*. Através da comparação das sequências gênicas verifica-se que o *MATE* isolado de *Sorghum bicolor* (*SbMATE*) não está relacionado com a família a qual pertence o gene *ALMT1* e, portanto é um novo gene de tolerância ao Al (Magalhães et al., 2007). O gene *SbMATE* foi isolado por Magalhães et al. (2007) através da técnica de clonagem posicional. A expressão do gene *SbMATE* é superior em ápices radiculares de genótipos tolerantes, e é induzida na presença de concentrações tóxicas de alumínio. Ele confere tolerância ao Al por liberação de citrato para a rizosfera de plantas tolerantes (Magalhães et al., 2008).

Um grande esforço tem sido feito para obtenção de plantas tolerantes ao Al, utilizando os conhecimentos gerados pelas técnicas de biologia molecular (Ezaki, 2001; Sasaki, 2004). Utilizando a transformação genética de plantas, os genes *ALMT1* e *SbMATE* têm sido expressos em outras espécies para aumentar a sua tolerância ao Al<sup>+3</sup>. Atualmente, esses genes já foram avaliados em espécies modelo como *Arabidopsis* e tabaco, e em algumas espécies agronomicamente importantes como a cevada (Delhaize et al., 2004, 2009), arroz (Sasaki et al., 2004) e o sorgo (Brandão, 2007).

Em 2004, Delhaize e colaboradores, mostraram plantas de cevada transgênica (*Hordeum vulgare* L.), expressando o gene de trigo (*Triticum aestivum* L.) *TaALMT1* (originalmente nomeado como *ALMT1*) responsável pelo efluxo de malato; característica originalmente não presente nesse genótipo. As plantas geradas mostraram um efluxo de malato semelhante ao das cultivares de trigo resistente ao Al. Também, a superexpressão da proteína *ALMT1* em plantas transgênicas de arroz aumentou a tolerância do evento gerado ao Al<sup>+3</sup> (Sasaki et al., 2004).

Apesar dos dois maiores genes de tolerância ao alumínio identificados até hoje, o *ALMT1* e o *SbMATE*, envolverem um mecanismo fisiológico similar



baseado na exudação de ácidos orgânicos em ápices de raízes, eles são distintamente diferentes (Magalhães et al., 2007).

## **2.6 Tolerância a concentrações tóxicas de alumínio mediada pelo gene**

### ***SbMATE***

Magalhães et al. (2004) mapearam em *Sorghum bicolor* um locus maior de tolerância ao alumínio na região terminal do cromossomo 3, o gene *SbMATE* presente no locus *Alt<sub>sb</sub>* foi identificado, através de mapeamento de populações, como sendo responsável por 80% do fenótipo de tolerância ao alumínio.

Uma alta similaridade entre o locus onde está localizado o gene *SbMATE* e os genes *Altg51340* de *Arabidopsis thaliana* e *Os01g69010* de arroz, foi identificada através do programa TBLASTX. Esses genes são representantes de uma família multigênica de transportadores de membrana *MATE* responsáveis pelo efluxo de pequenas moléculas orgânicas. No caso do sorgo, o mecanismo fisiológico que caracteriza a tolerância ao alumínio é a exudação de citrato pelas raízes em presença de níveis tóxicos de alumínio (Magalhães et al., 2007).

Magalhães et al. (2007) mostraram através da transformação genética da epiderme de cebola com a proteína de fusão *SbMATE::GFP* que o *SbMATE* é uma proteína de membrana. Mostraram também, por análise quantitativa de RT-PCR, que o *SbMATE* é mais expresso nos primeiros centímetros apicais das raízes, e após algumas horas de exposição ao alumínio. Existindo uma relação direta entre o tempo de exposição da raiz ao  $Al^{+3}$  e a exudação de ácido orgânico; quanto mais tempo em contato com o alumínio, maior é a exudação.

Eventos transgênicos de *Arabidopsis thaliana* e trigo superexpressando o gene *SbMATE* de forma constitutiva são substancialmente mais tolerantes ao alumínio quando comparado às linhagens isogênicas não transgênicas (Magalhães et al., 2007).

## 2.7 Avaliação da tolerância ao alumínio em plantas

Alguns métodos de seleção têm sido empregados para a avaliação da tolerância ao alumínio em plantas, dentre elas destacam-se: cultura em campo ou em solo sob condições controladas e cultura em soluções nutritivas, ambas com vantagens e desvantagens.

A avaliação sob condições de campo utiliza dois níveis de saturação de alumínio: nível alto (60% ou 80%), nível não-tóxico (15%) para a maioria das culturas (Olmos et al., 1976). As cultivares são classificadas quanto à sua tolerância, e as que apresentam maior interesse em programa de melhoramento são aquelas que apresentam produção em altos níveis de alumínio e respondem a níveis crescentes de calagem (Ferreira et al., 2006).

Outra tecnologia usada é a avaliação em casa de vegetação, para avaliar o grau de tolerância ou de susceptibilidade de genótipos vegetais ao alumínio. São feitos dois tratamentos nos vasos com amostra de solo ácido, com calcário e sem calcário. Com essa metodologia, Silva (1983), através do aprofundamento do sistema radicular, identificou cultivares de sorgo tolerantes ou sensíveis ao alumínio.

Um método muito utilizado também é o método da coloração pela hematoxilina. O seu princípio baseia na oxidação da hematoxilina para hemateína por  $\text{NaIO}_3$ , ou outros agentes oxidantes, que em presença de íons metálicos (Cr, Fe ou Al), tem propriedade de corar ácidos nucléicos (Gill et al., 1974). Quanto mais susceptíveis os genótipos forem, mais intensa a coloração das radículas, devido à grande quantidade de alumínio no interior das células (Martines, 1977).

Devido às limitações e o tempo gasto em cultura de campo ou solo, um dos métodos mais utilizados para a avaliação de genótipos quanto à tolerância ao Al, é a solução hidropônica sob condições controladas. Esse método permite a avaliação não destrutiva e em pouco tempo de uma grande quantidade de plantas

com alta precisão, considerando a influência do alumínio, proporcionando ganhos significativos para a eficiência de seleção (Cançado et al., 1999).

Uma característica da solução nutritiva é a combinação de uma série de componentes químicos essenciais às plantas, portanto toda a composição da solução, a dose e a condução do experimento, assim como o que será avaliado no experimento, são fatores que devem ser determinados com base em cada espécie a ser avaliada (Crestani, 2008).

Um dos protocolos utilizados é o proposto por Magnavaca (1982), que é caracterizado pela distinção de plantas tolerantes ao Al. O autor propôs o uso da seguinte solução para avaliar a herança do caráter tolerância ao alumínio em milho: 3.527 mM de Ca; 2.310 mM de K; 855 mM de Mg; 10.857 mM de  $\text{NO}_3^-$ ; 1.300 mM de  $\text{NH}_4^+$ ; 45 mM de P; 587 mM de S; 25 mM de B; 595 mM de Cl; 77 mM de Fe; 9,1 mM de Mn; 0,63 mM de Cu; 0,83 mM de Mo; 2,29 mM de Zn; 1,74 mM de Na; 75 mM de EDTA; e adicionado  $6 \text{ mgL}^{-1}$  de Al fornecido na forma de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , onde as plântulas permaneceram por 168 horas.

Dentre os critérios analisados, está a avaliação do Comprimento da raiz seminal de cada plântula que é medido após 24 ( $C_{24h}$ ) e 48 ( $C_{48h}$ ) horas em contato com a solução nutritiva sem Al. Utilizando essas medidas é possível obter o Comprimento controlado ( $C_c = C_{48h} - C_{24h}$ ). Após cinco dias de crescimento em solução nutritiva com alumínio ( $C_{120h + Al}$ ), é possível determinar a porcentagem do Crescimento Radicular Relativo (%CRR) =  $[(C_{120h + Al} - C_{48h}) / C_c \times 5] \times 100$ . Quando não é possível a adoção de um controle independente para cada indivíduo estudado, o  $C_c$  é multiplicado por cinco, pois é assumido que a taxa de crescimento na ausência de Al é uniforme entre os genótipos durante o período de cinco dias de observação.

Quando as linhagens têm um controle independente sem adição de Al no período experimental, o percentual de Crescimento Líquido Relativo (%CLR) isto é, o crescimento radicular de plantas tratadas com Al em relação à condição

controle, pode ser obtido. Os valores de CLR são obtidos através da fórmula:  $CLR = \frac{CL(+Al) - CL(-Al)}{CL(-Al)}$ , onde CL é o crescimento líquido, (+Al) presença de alumínio, e (-Al) ausência de alumínio, controle. O crescimento líquido é o comprimento de um dia menos o comprimento radicular imediatamente antes da submissão ao estresse. Sendo assim, é possível discriminar fenotipicamente os genótipos tolerantes ou sensíveis, pela avaliação quantitativa da inibição do crescimento radicular sob estresse de alumínio (Aniol, 1990).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Construção gênica

Para a transformação dos embriões imaturos e calos de milho, foram utilizadas duas construções gênicas, contendo o gene *SbMATE* sob o controle do promotor constitutivo da *Ubiquitina* (Christensen et al., 1992) e do terminador *NOS*. No cassete utilizado para a transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, o vetor utilizado foi o *pTF101* (Paz et al., 2004), enquanto que para a transformação via biobalística foi utilizado o plasmídeo *pCAMBIA 3301* (Cambia, Canberra, Austrália).

O promotor *Ubiquitina* e o terminador *NOS* foram extraídos do plasmídeo *pAHC17* (Christensen et al., 1996) e transferidos para o plasmídeo *pCAMBIA 3301* após uma digestão total com a enzima *HindIII* (Invitrogen) e parcial com a enzima *EcoRI* (Invitrogen). O gene *SbMATE* foi obtido por transcrição reversa do mRNA das linhagens de sorgo SC283 com oligo dT e PCR utilizando os primers AGA GGA TCC ATG GAG GAA CACC e GAC GGA TCC TCA CTG CCG AAG contendo nas extremidades sítios para a enzima *BamHI* (sublinhado). Após a amplificação, o fragmento gerado foi clonado no vetor *TOPO TA* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA). Posteriormente o fragmento foi digerido parcialmente com *BamHI* e subclonado no vetor *pCAMBIA 3301*, o qual já continha o promotor da *Ubiquitina* e terminador *NOS*.

O plasmídeo *pCAMBIA 3301* contendo a construção *Ubi::SbMATE::NOS* foi sequenciado (Anexo A) para confirmar sua integridade e, posteriormente, foi amplificado em *Escherichia coli* (Anexo B), purificado utilizando o QIAfilter™ Plasmid Giga Kit (Quagen Sciences, Maryland 20874, USA) conforme descrito pelo fabricante, e usado para transformação via bombardeamento de micropartículas.

Para a inserção da construção *Ubiq::SbMATE::NOS* no vetor binário *pTF101*, esse cassete foi clivado do plasmídeo *pCAMBIA 3301* utilizando uma digestão total com *HindIII* e parcial com *EcoRI*, a banda correspondente ao tamanho esperado de 4,02 kb da construção foi clonada nos sítios das enzimas *HindIII* e *EcoRI* do plasmídeo *pTF101*. O marcador de seleção para plantas contido no vetor binário *pTF101* é o gene *bar* sob o controle do promotor *CaMV35S*. Em seguida, o cassete gênico foi transformado via choque térmico (Anexo B) em *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101, purificado (Anexo B) e utilizado na transformação de milho mediada por *Agrobacterium*.

### **3.2 Material vegetal**

O material vegetal utilizado neste trabalho é o genótipo de milho temperado (*Zea mays*), híbrido Hi II cultivado em casas de vegetação do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo.

O híbrido Hi II é resultante de duas linhagens obtidas do cruzamento entre as linhagens A188 e B73. Desse cruzamento inicial foram selecionadas duas linhagens denominadas Parental A e Parental B com grande capacidade de formação de calos do Tipo II em cultura de tecidos. A frequência de formação de calos do Tipo II, dessas linhagens, em meio N6 contendo 2,4-D e prolina é de quase 100%. O resultado do cruzamento entre essas duas linhagens foi designado “Hi II”, um híbrido com alto vigor e uma excelente resposta na cultura de tecidos (Armstrong et al., 1991). O germoplasma “Hi II” é muito útil para experimentos que exigem uma alta frequência de calos do Tipo II.

### **3.3 Cultura de tecidos**

Espigas foram coletadas entre 10 a 12 dias após a polinização e embriões com 1,0 a 1,5 mm de comprimento foram utilizados. As espigas foram

esterilizadas por imersão, durante 25 minutos, em uma solução contendo 50% de hipoclorito de sódio comercial (água sanitária 5,47%) e 0,01% de Tween 20. Após a esterilização, as espigas foram lavadas quatro vezes por cinco minutos cada com água destilada e autoclavada, sendo todo o procedimento realizado em câmara de fluxo laminar.

A coleta e o plaqueamento dos embriões imaturos foram feitos com o auxílio de uma espátula ou pinça inserida na base da espiga, para facilitar o manuseio. A espiga foi colocada sobre uma placa de Petri e, com o auxílio de um bisturi, uma camada de 1 a 2 mm das extremidades de uma fileira foi cortada, expondo o endosperma. Os embriões foram retirados dos grãos com uma espátula de ponta fina e cultivados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultura. Entre 25 e 30 embriões foram cultivados em meio de iniciação de calos (meio IC) (Anexo K) no escuro, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , por dois meses com subcultivos a cada 14 dias.

### **3.4 Transformação mediada biobalística**

Todas as etapas da transformação mediada por biobalística foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Carneiro et al. (2004). Para o bombardeamento de partículas foram utilizados calos com sete dias após o subcultivo.

Calos embriogênicos de milho foram transferidos para o meio IC osmótico (Anexo K) entre 3 e 4 horas antes do bombardeamento visando diminuir a turgescência das células e minimizar os danos causados pelas micropartículas.

#### **3.4.1 Precipitação do DNA sobre as micropartículas**

Em um microtubo foi pesado 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 e acrescentado 1,0 mL de etanol 70%. A mistura foi agitada em agitador vortex por 20 min. Em seguida, o etanol foi retirado por centrifugação a 14.000 rpm durante cinco minutos. O pellet foi lavado com 1,0 mL de água mili-Q estéril, duas vezes. O pellet formado após a última lavagem foi ressuspensionado em 1,0 mL de glicerol estéril 50% (v/v).

Para a precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio 50 µL da suspensão de micropartículas foram misturadas a 5 µL de DNA plasmidial purificado, na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram acrescentados 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M juntamente com 20 µL de espermidina 0,1 M. Esta solução foi mantida durante 3 minutos sob agitação moderada em vortex e repousada por outros 3 minutos. Após uma centrifugação de 5 segundos a 5.000 rpm, o pellet foi lavado com 150 µL de etanol 70% por duas vezes. O pellet formado pelas micropartículas cobertas com o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 60 µL de 100% etanol P.A. Sete microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton<sup>TM</sup> (Du Pont, Barueri, SP). Essas membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse, utilizando 1000 psi de pressão de gás hélio, sendo os calos posicionadas a 9 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidas constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana macrocarreadora (8 mm), a distância entre a membrana macrocarreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

#### **3.4.2 Seleção de plantas transgênicas após o bombardeamento**

Calos bombardeados foram cultivados em meio IC (Anexo K) por 14 dias, em câmara escura, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ . A seleção teve início na terceira semana, quando os calos embriogênicos foram transferidos para o meio de seleção SE



(Anexo G) suplementado com 3 mg/L de glufosinato de amônia (herbicida Finale). A cada 2 semanas os calos eram subcultivados em doses crescentes de glifosinato de amônio de 6 e 9 mg/L. Depois de 8 a 10 semanas, os calos que sobreviveram ao processo de seleção foram transferidos para o meio de maturação RM (Anexo K), suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia, e mantidos por 2 a 4 semanas em câmara escura, a 25°C. Embriões com coloração branco-leitosa foram transferidos para meio de germinação suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia e mantidos sob um fotoperíodo de 16 horas.

As plantas que se desenvolveram foram transferidas para vasos contendo uma mistura de solo e matéria orgânica (TDP 30/15) produzida pela Terra do Paraíso, Holambra, na proporção de 3:1.

Durante os três primeiros dias de aclimação, as plantas foram mantidas sob uma cobertura plástica, para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, sucessivos furos foram feitos no plástico, até a exposição total das plantas ao ambiente.

### **3.5 Transformação mediada *Agrobacterium tumefaciens***

A transformação mediada *Agrobacterium tumefaciens* foi realizada segundo o protocolo descrito por Frame et al. (2002).

A partir do estoque a -80°C de *Agrobacterium* foi feita uma estria em meio YEP (Anexo C) suplementado com spectinomicina a 100 mg/L e canamicina a 50 mg/L com o objetivo de obter colônias isoladas. Essas placas foram mantidas em temperatura de 28°C por três dias. A partir de uma colônia isolada, foi feita uma estria simples com o objetivo de multiplicação celular, essa placa foi mantida em temperatura de 19°C em BOD por mais três dias.

Para a transformação, um loop de 3 mm (alça de platina) da bactéria foi inoculado em 5 mL de meio de infecção (Anexo D) suplementado com

acetoseringona (AS) 100 µM (Anexo H). Após o crescimento da agrobacteria ter atingido uma OD<sub>550</sub> entre 0,3 a 0,4, aproximadamente 4 a 5 horas a 200 rpm, 28°C, essa foi utilizada para infectar embriões imaturos do milho Hi II. Para a infecção, os embriões imaturos foram lavados por duas vezes com o meio de infecção + AS (100 µM) sem bactéria, e em seguida a suspensão bacteriana foi adicionada. O tubo contendo embriões e bactéria foi homogeneizado gentilmente por vinte vezes e mantido em repouso por 5 minutos no escuro. Após esse período, os embriões foram plaqueados, com o eixo embrionário em contato com o meio, em meio de co-cultivo (Anexo E). Os embriões permaneceram nesse meio por três dias a 19°C e, em seguida foram transferidos, por 7 dias, para meio de repouso (Anexo F) contendo 250 mg/L cefotaxime para eliminação da *Agrobacterium tumefaciens*. A seleção de calos transgênicos foi iniciada na segunda semana após a infecção e feita de maneira idêntica à descrita no item 3.4.2.

### **3.6 Análise molecular**

#### **3.6.1 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase**

A extração de DNA genômico das plantas produzidas foi realizada segundo Saghai-Marrof et al. (1984). Foram feitas reações de PCR para detecção dos genes *SbMATE* e *bar* em todas as amostras de DNA em um volume final 25 µL, utilizado 0,8X de tampão sem Mg (Invitrogen), 0,8 mM de dNTPs, 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 ng de DNA template e 0,4 µM de cada um dos *Primers* ([*SbMATE*: JL 57 F (GTG CTG GAT CCG ATC CTG AT) x JL 58 R (CAC TGC CGA AGA AAC TTC CA) e *bar*: BarF (5'AGA AAC CAC GTC ATG CC3') e BarR (5'TGC ACC ATC GTC AAC CAC3')]) e completou-se com H<sub>2</sub>O. Para o gene *SbMATE*, os ciclos de amplificação foram constituídos de uma desnaturação inicial de 1

segundo a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 40 segundos e extensão com 72°C por 1 minuto e meio, seguido de uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o gene *bar* o ciclo foi de uma desnaturação inicial de 5 segundos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento 60°C por 15 segundos e extensão 72°C por 15 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 15 segundos. Os produtos dessas reações foram separados por eletroforese a 100 Volts por 40 minutos, em gel de agarose 1% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Os géis tratados com brometo de etídio (1 µL/mL) foram visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Gel Logic 2000 Imaging System (Carestream Health, New Haven, CT) e as imagens capturadas e estocadas no programa Kodak Molecular Imaging Software Ready – Standard Edition v.4.5.0.

### **3.6.2 Southern blot**

Para a confirmação da presença e identificação do número de cópias do gene *SbMATE* no eventos gerados, DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, respectivamente. O DNA digerido foi separado em gel de agarose 0,8% utilizando tampão TAE 90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0. Em seguida, o gel foi tratado com brometo de etídio (1 µL/mL) e visualizados sob luz ultravioleta. As imagens capturadas e estocadas no programa Kodak Molecular Imaging Software Ready – Standard Edition v.4.5.0.

O gel foi lavado em solução de depurinação (355,6 mM HCl) por 10 minutos, denaturado em tampão 1,5M de NaCl 0,5M de NaOH por 30 minutos e neutralizado (1,5M de NaCl e 0,5M de Trizma base e pH 7,5) por 30 minutos. Todas as etapas acima citadas foram feitas sob agitação em temperatura ambiente. Em seguida, o DNA foi transferido por capilaridade para uma membrana de nitrocelulose Amersham Hybond™ - N<sup>+</sup> (GE-Healthcare,

Buckinghamshire) de acordo com a instrução do fabricante. Os transgenes foram detectados usando a sonda *SbMATE*, marcada e identificada com o kit Amersham™ AlkPhos Direct Labelling Reagents (GE-Healthcare, Buckinghamshire) de acordo com instruções do fabricante. A sonda foi preparada por digestão parcial do plasmídeo pCAMBIA 3301 contendo a construção *Ubi::SbMATE::NOS*, utilizando a enzima *Bam*HI, e purificado com o kit GENE CLEAN® II (Q-Biogene, Rutherford Road, Carlsbad), conforme descrito pelo fabricante.

### **3.6.3 Real Time PCR**

#### **3.6.3.1 Desenhos de “primers” e sondas**

Sequências dos genes-alvo, *SbMATE* e Actina, foram obtidas do Genbank e exportadas para o programa Primer Express v 3.3 (Applied Biosystems).

#### **3.6.3.2 Obtenção do RNA total**

A extração de RNA total foi feita utilizando RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com instruções do fabricante.

#### **3.6.3.3 RT-PCR: Transcriptase reversa – reação em cadeia da polimerase**

Para a produção do cDNA foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para cada amostra em um volume final de 10 µL foram necessários 2 µg de RNA total, 2X tampão RT, 0,8 mM de dNTP's mix, 2X de *primers* RT random, 4,2 µL de H<sub>2</sub>O nuclease-free e 1,0 µL de transcriptase reversa. As reações foram feitas em um termociclador com um gradiente de temperatura para anelamento dos *primers*,

programado para 10 minutos a 25°C, 120 minutos à 37°C, 5 minutos à 85°C e 4°C ∞.

Foram feita diluições 1:10 das amostras de cDNA's para o ensaio *SbMATE* com Syber. Para cada amostra utilizou-se 10 µL de Fast Green, 4µL de *primer*, 4 µL de cDNA completando o volume final de 20 µL com H<sub>2</sub>O autoclavada e livre de RNase. Utilizou-se *primers* para o gene alvo, *SbMATE* (5 µM) e *primers* para o gene constitutivo Actina (1,43 µM).

As amostras de PCR Master Mix foram aplicadas em triplicata em uma placa especial para PCR em Tempo Real. A placa foi analisada pelo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, USA). Toda programação foi feita seguindo o manual de instruções. As condições do termociclador foram: 48°C por 30 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

### **3.7 Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva**

Avaliação da tolerância ao alumínio foi realizada em solução nutritiva utilizando como controle os genótipos não transgênicos, Parental A, Parental B (ambos genitores do Hi II), L3 (tolerante ao Al), AxB (Hi II), L53 (linhagem sensível ao Al) e Hi II autofecundado / F2 (genótipo utilizado como material vegetal desse trabalho) e 47 eventos transgênicos (Tabela 1) da geração T1.

As sementes foram desinfetadas em solução 0,4 a 0,6% cloro ativo durante 5 minutos e germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos com água deionizada por quatro dias em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ , noturna de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas com capacidade para 8,5 litros de solução nutritiva. As plântulas foram mantidas por 24 horas em solução nutritiva completa sem Al (Magnavaca et al., 1987), com o pH ajustado

para 4,0 (Tabela 2, anexo), sob aeração constante. Após esse período, as plantas foram transferidas para uma nova solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém adicionando-se  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  nos tratamentos contendo Al. Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento, sob as mesmas condições utilizadas para a germinação.

Inicialmente foi realizado um teste de concepção. As testemunhas foram analisadas em solução nutritiva com três níveis de Al tóxico com as seguintes atividades  $\{\mu\text{M Al}^{+3}\}$  e concentrações equivalentes  $[\mu\text{M Al}]$ : {27}, {39} e {60} e [148], [222] e [360], respectivamente, eficientes para discriminar genótipos de milho quanto à tolerância ao Al. Avaliações posteriores dos genótipos transformados foram conduzidas na concentração de 360  $\mu\text{M}$  de Al, que corresponde à {60}  $\mu\text{M}$ , onde as chaves indicam atividade de Al livre estimadas com o programa GEOCHEM-PC (Parker et al., 1995). Cada evento foi representado por diferentes quantidades de sementes (Tabela 1), devido à diferença na quantidade de sementes germinadas por evento transgênico regenerado em casa de vegetação. Cada bandeja foi composta de plântulas transgênicas e uma fileira de testemunhas.

Foi avaliada a taxa de crescimento radicular (mm/dia) no momento das transferências das plântulas para solução nutritiva sem Al; após 24 horas das plântulas em solução nutritiva sem Al; e após cinco dias em solução nutritiva com Al.

O Comprimento da raiz seminal de cada plântula foi medido no momento de transferência, após 24 ( $C_{24h}$ ) e 48 horas ( $C_{48h}$ ) de crescimento em solução nutritiva completa, sem alumínio, para a obtenção do Comprimento controlado ( $C_c = C_{48h} - C_{24h}$ ), e após cinco dias de crescimento em solução nutritiva contendo Al, ( $C_{120h + Al}$ ). O índice utilizado para avaliar a tolerância foi CRR (% Crescimento Radicular Relativo) =  $[(C_{120 + Al} - C_{48h}) / C_c \times 5] \times 100$ . Nos eventos T1, a adoção de um controle independente não foi possível, uma

vez que cada indivíduo da população representa um genótipo distinto. Assim, os valores de Comprimento controlado foram multiplicados por cinco, assumindo-se que as taxas de crescimento na ausência de Al são uniformes entre os eventos durante o período de exposição de cinco dias, ou que as variações nas taxas são uniformes entre eventos. Para os genótipos onde foi possível a adoção de um controle independente sem adição de Al durante todo o período experimental, foi obtido o Crescimento radicular Líquido no período de cinco dias em cada uma das três concentrações de Al:  $CL = C_{120h + Al} - C_{48h}$ . Valores percentuais de Crescimento Líquido Relativo (CLR) foram obtidos pela divisão do crescimento líquido medido após cinco dias de exposição ao Al pelo crescimento líquido radicular das plântulas cultivadas na ausência de Al (controle). Para cada tratamento com Al, foram obtidas as médias de CL de cada uma das três parcelas experimentais compostas por sete plântulas cada. Essas médias foram divididas pela média global do tratamento controle sem Al, sendo assim gerados três valores de CLR para cada genótipo de milho.

TABELA 1 Quantidade de sementes T1, obtidas via transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (A) e Biobalística (B), que foram analisadas em solução hidropônica contendo {60}  $\mu\text{M}$  de Al.

Genótipos	Número de sementes	Genótipos	Número de sementes	Genótipo	Número de sementes
A1	2	B25	25	B49	40
A2	32	B26	2	B52	9
A4	31	B27	6	B53	1
A5	23	B29	8	B54	1
A8	30	B30	1	B55	3
A14	35	B33	19	B56	1
A19	35	B35	31	B57	3
A25	29	B34	39	B58	1
B4	5	B36	1	B59	35
B5	15	B37	26	B60	4
B7	2	B38	14	B61	4
B19	4	B39	17	B64	6
B20	2	B40	12	B65	25
B22	11	B42	14	B66	9
B21	23	B43	19	B67	30
B24	8	B44	37		

### 3.8 Análises Estatísticas

A análise de variância dos valores de %CLR e a comparação entre grupos de média pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade foram realizados para os genótipos não transgênicos submetidas às atividades de {27},



{39} e {60}  $\mu\text{M}$  Al em solução nutritiva, com o auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000).

O teste de  $\chi^2$  foi utilizado para avaliar a segregação da tolerância ao Al em {60}  $\mu\text{M}$ , utilizando os valores de %CRR, nas progênies T1, derivadas da autofecundação das plantas T0. Foi feita uma análise de variância das médias de CRR em cada uma das classes genóticas para avaliar a tolerância ao Al. E foi feita um correlação entre a expressão do gene *SbMATE* com a porcentagem do crescimento relativo radicular.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, inicialmente, foram geradas, via transformação mediada por *Agrobacterium* e biobalística, plantas de milho expressando o gene de tolerância ao alumínio *SbMATE*, isolado da linhagem tolerante de sorgo SC283. Em seguida, os eventos T0 foram autofecundados gerando as sementes T1. Todas as sementes T1 foram germinadas e submetidas ao estresse de alumínio em solução hidropônica, para a avaliação da tolerância ao alumínio. Após uma seleção tendo com base o crescimento radicular, a tolerância ao alumínio e o desenvolvimento dos ápices radiculares dessas plantas, foi realizada análise de *Southern blot* e de expressão do gene *SbMATE* via PCR em Tempo Real em um subgrupo de 15 dessas plantas.

### 4.1 Clonagem gênica

A construção gênica utilizada para a produção das plantas transgênicas de milho contém o gene *SbMATE* sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina de milho e o terminador NOS (*Ubi::SbMATE::NOS*) (Figura 2).

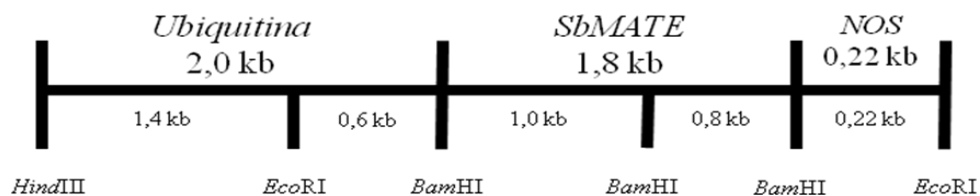


FIGURA 2 Construção gênica *Ubi::SbMATE::NOS* utilizada para transformação genética das plantas de milho.

O promotor da Ubiquitina e o terminador *NOS* foram obtidos do plasmídeo *pAHC17* (Figura 3 e 4) e transferidos para o plasmídeo *pCAMBIA 3301*, gerando o plasmídeo *pCAMBIA 3301/Ubi::NOS* (Figura 5). O plasmídeo *pCAMBIA 3301* possui em sua estrutura o gene de seleção *bar*, que codifica para a proteína fosfinotricina acetiltransferase, sob o controle do promotor constitutivo viral *CaMV35S*.

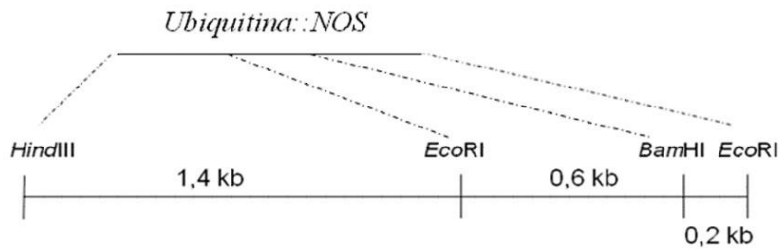


FIGURA 3 Isolamento do promotor Ubiquitina e terminador NOS do vetor *pAHC17* (Christensen et al., 1996).

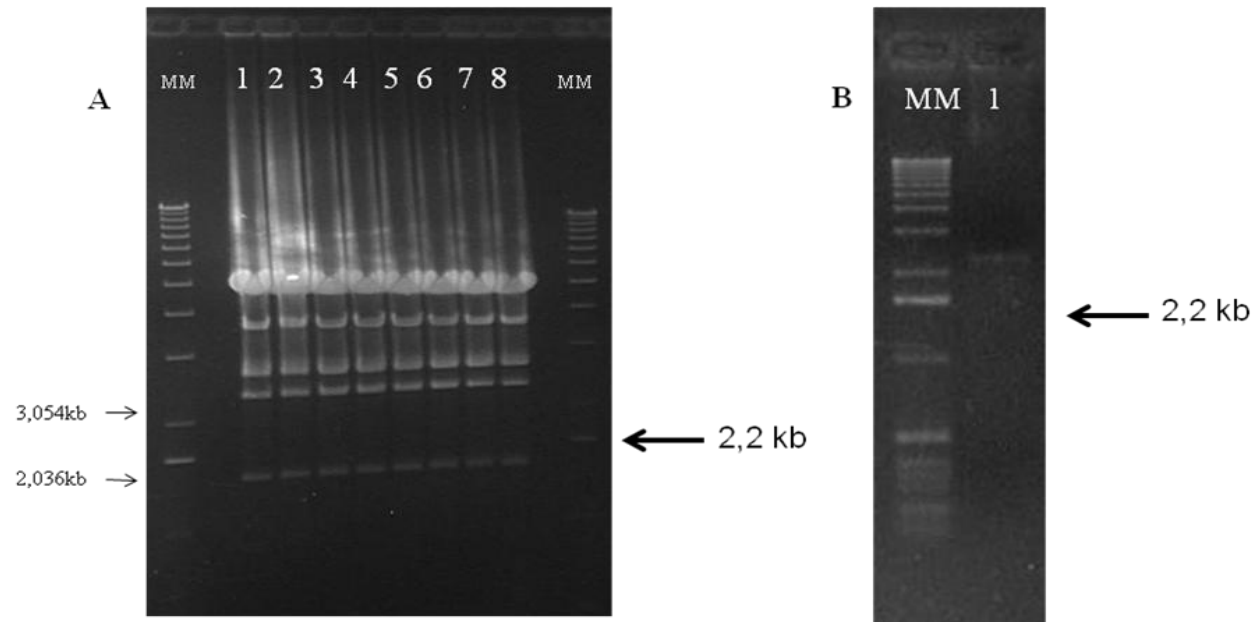


FIGURA 4 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio correspondente ao isolamento do promotor da Ubiquitina e terminador *NOS* do vetor *pAHC17*. (A) Digestão total com *HindIII* e parcial com *EcoRI* do plasmídeo *pAHC17*.: (1) 1 minuto; (2) 2 minutos; (3) 3 minutos; (4) 4 minutos; (5) 5 minutos; (6) 6 minutos; (7) minutos; (8) minutos. A seta indica o fragmento de 2,2 kb correspondente ao promotor da Ubiquitina e o terminador *NOS*; (B) Confirmação da purificação da banda isolada do gel em A, referente à *Ubi::NOS*.

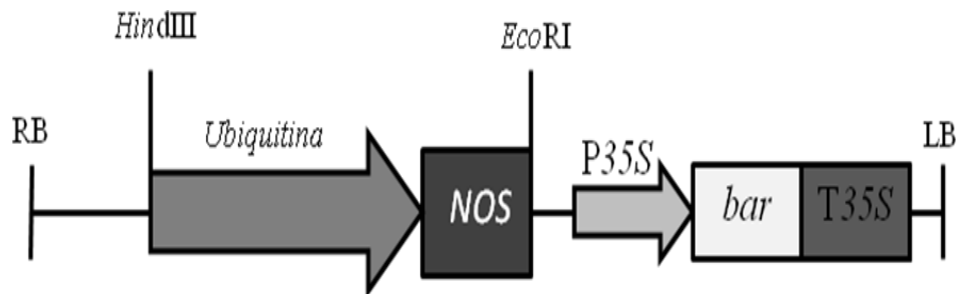


FIGURA 5 Vetor binário *pCAMBIA 3301* contendo a inserção do promotor e terminador *Ubi::NOS* entre os sítios de restrição *HindIII* e *EcoRI*. O *pCAMBIA* possui o gene de seleção fosforotransferase acetil (*bar*) sob o controle do promotor e terminador *CaMV35S* e foi utilizado para transformação mediada via biobalística.

O gene *SbMATE* foi isolado da linhagem de sorgo SC283 via transcrição reversa e clonado no plasmídeo *TOPO TA* gerando o plasmídeo *TOPO TA/SbMATE* (Figura 6). Essa clonagem foi realizada, por esse plasmídeo ser grande, sendo possível posteriormente o isolamento do tamanho exato do fragmento desejado, visto que depois da transcrição reversa, esse fragmento continha uma sequência de alguns pares de base não desejados, nas extremidades do fragmento.

Em seguida, o plasmídeo *TOPO TA/SbMATE*, foi digerido parcialmente com a enzima *BamHI*, gerando um fragmento de 1,8 kb (Figura 6) correspondente ao gene *SbMATE*, e esse foi subclonado no sítio da enzima *BamHI* do plasmídeo *pCAMBIA 3301/Ubi::NOS*, produzindo o plasmídeo *pCAMBIA 3301 / Ubi::SbMATE::NOS* que foi utilizado para a transformação mediada biobalística. A digestão parcial ao invés da digestão total do plasmídeo *TOPO TA/SbMATE* foi necessária pois existe um sítio de *BamHI* dentro do gene *SbMATE*.

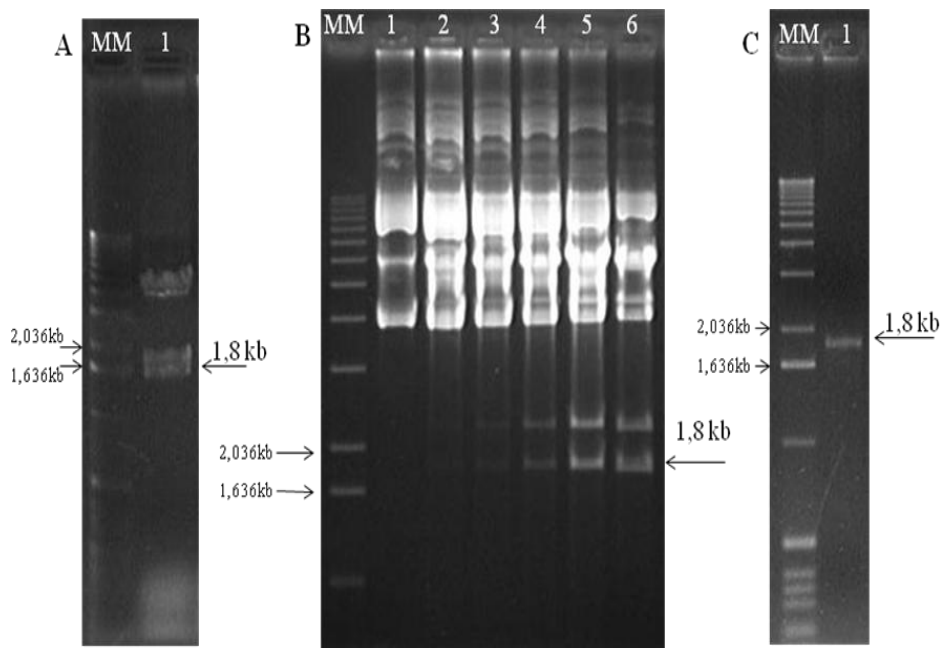


FIGURA 6 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando a clonagem do cDNA do gene *SbMATE* no vetor *TOPO TA*. O gene *SbMATE* foi amplificado via transcrição reversa da linhagem de sorgo SC283 e clonado nos sites *EcoRI* e *BamHI* do plasmídeo *TOPO TA* gerando o plasmídeo *TOPO TA/ SbMATE*. **(A)** Digestão total com *EcoRI* confirmando a presença do gene *SbMATE* no vetor *TOPO TA*. **(B)** Digestão parcial com *BamHI* do plasmídeo *TOPO TA* contendo o gene *SbMATE*; (1) 0 minuto, (2) 1 minuto, (3) 2 minutos, (4) 3 minutos, (5) 4 minutos, (6) 5 minutos. **(C)** Fragmento purificado, correspondente ao *SbMATE* isolado do gel B.

Após essa subclonagem, foi realizado o sequenciamento da região *Ubi::SbMATE::NOS* do plasmídeo *pCAMBIA 3301 / Ubi::SbMATE::NOS* utilizando três *primers* na posição *forward* ou 5' (F, U5, MJ13) e dois *primers* na posição *reverse* ou 3' (UbiFa2, R) (Figura 7). A integridade das sequências geradas foi confirmada após análises de alinhamento.

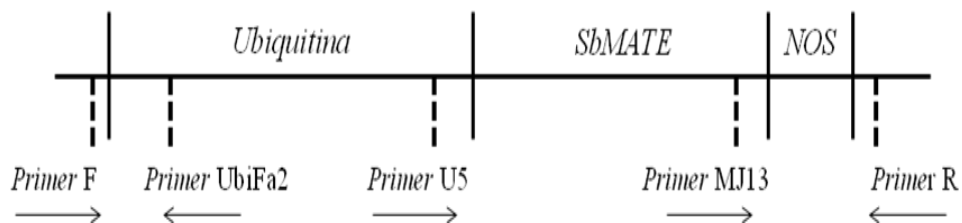


FIGURA 7 Posição do anelamento dos *primers* na construção *pCAMBIA 3301 / Ubi::SbMATE::NOS*, confirmando a integridade das sequências geradas. O tracejado indica o local, e as setas indicam a posição do anelamento dos *primers*.

Na transformação de milho mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o vetor binário utilizado foi o *pTF101* (Figura 8), esse vetor binário também contém o gene de seleção *bar* sob o controle do promotor constitutivo viral *CaMV35S*. Para a subclonagem do gene *SbMATE* neste vetor, foi feita uma digestão total da construção gênica com a enzima de restrição *HindIII* e uma parcial com a *EcoRI* (Figura 9), tendo como objetivo isolar o gene quimérico *Ubi::SbMATE::NOS*, que foi subclonado no plasmídeo *pTF101*, nos sítios enzimáticos de *HindIII* e *EcoRI* produzindo o plasmídeo *pTF101 / Ubi::SbMATE::NOS*.

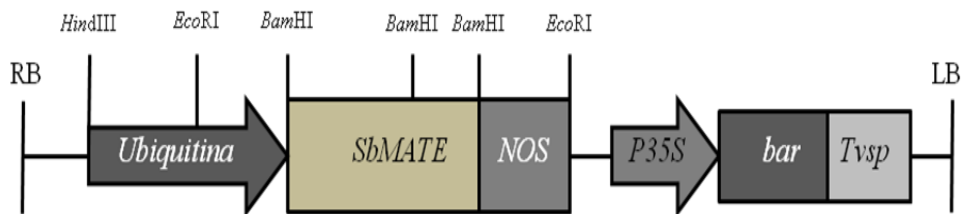


FIGURA 8 Vetor binário *pTF101* (Paz et al., 2004) contendo o gene *SbmMATE* sob o controle do promotor *Ubiquitina* e o terminador *NOS*, gerando a construção *Ubi::SbmMATE::NOS*, entre os sítios de restrição *HindIII* e *EcoRI*, utilizado para transformação via *Agrobacterium*. O cassete contém em sua construção o gene de seleção *bar* sob o controle do promotor (P) 35S e o terminador (T) *vsp*.

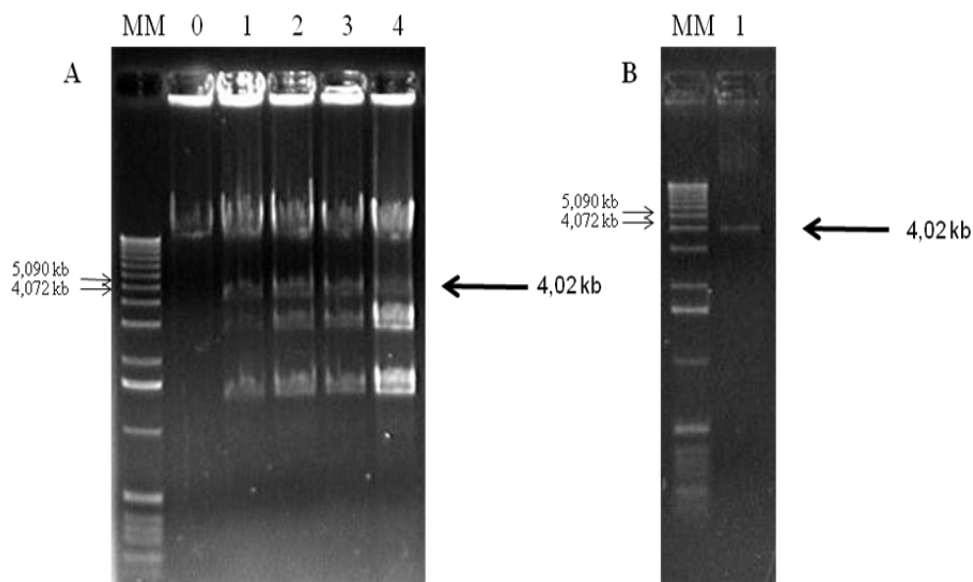


FIGURA 9 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (A) Digestão da construção *Ubi::SbmMATE::NOS*, total com *HindIII* e parcial com *EcoRI*, com os tempos: 0 (0 min sem *EcoRI*); 1 (1 min); 2 (2 min); 3 (3 min) e 4 (10 min) em ordem crescente de aplicação; (B) Banda purificada correspondente à construção *Ubi::SbmMATE::NOS* isolada do gel A.



## 4.2 Transformação genética de milho

Calos embriogênicos subcultivados por sete dias, em meio de indução de calos, foram utilizados nas transformações de milho Hi II via biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*.

Em 27 placas bombardeadas utilizando 2.700 calos, foram regeneradas 140 plantas, correspondendo a 46 eventos diferentes. Essas plantas foram transferidas para casa de vegetação e tratadas com 1 mg.L<sup>-1</sup> de fosfotricina acetiltransferase (Herbicida Finale) quando atingiram o estágio de 8 folhas. Após a aplicação do herbicida, 115 plantas desenvolveram normalmente e foram autofecundadas ou cruzadas com o progenitor Hi II não transgênico. A frequência de transformação observada foi da ordem de 1,7% (46 eventos / 2.700 calos bombardeados). A eficiência da transformação foi similar a de 1,9% obtida por Frame et al. (2000) bombardeando calos embriogênicos de Hi II com partículas de ouro de 1,0 µm. Entretanto, foi mais baixa do que a eficiência de 7,1% comunicada por Shou et al. (2004) ou a faixa de 4,6 a 31,4% comunicadas por Frame et al. (2000), utilizando partículas de ouro de 0,6 µm no bombardeamento de milho Hi II. Toda a transformação de milho do presente trabalho foi realizada com partículas de tungstênio de tamanho variado, uma mistura contendo partículas até 10 µm. Conforme mostrado por Frame et al. (2000) o tamanho da partícula utilizada no bombardeamento é um dos fatores responsáveis pela recuperação de clones transgênicos. A redução do tamanho da partícula serve para minimizar o ferimento causado nas células alvo e, conseqüentemente, melhorar a regeneração celular e a eficiência de produção de plantas transgênicas.

A eficiência da transformação obtida utilizando a transformação mediada por *Agrobacterium* foi de 2,66%, sendo recuperados oito calos transgênicos a partir de 300 embriões infectados. A frequência de transformação

de milho Hi II pela agrobacteria obtida neste trabalho está dentro da faixa de 1,1% a 22,2% apresentada por Frame et al. (2002).

### 4.3 Análise molecular

Para a comprovação da transgenia nos eventos T0 e na primeira geração de autofecundação (T1), foram realizadas análises de PCR, *Southern blotting* e PCR em Tempo Real.

#### 4.3.1 Amplificação do gene *SbMATE* via PCR

O DNA total foi extraído das plantas de milho regeneradas em casa de vegetação e foram realizadas PCR de plantas T0 e T1, utilizando dois pares de *primers* JL57 F e JL58R e, barF e barR que amplificam fragmentos de 788 pb do gene *SbMATE* (Figura 10) e de 407 pb do gene *bar*, respectivamente.

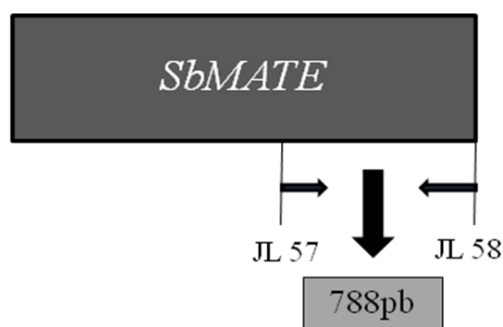


FIGURA 10 Posição de anelamento dos primers JL57F e JL58R no gene *SbMATE*, presente na construção gênica *Ubi::SbMATE::NOS*. Os *primers* geram um fragmento de 788 pb do gene *SbMATE*.

#### 4.3.1.1 Plantas T0

Análises de PCR confirmaram a presença do gene *SbMATE* em 39 dos 46 eventos T0 gerados via biobalística, o que corresponde a 84,78% de cotransformação dos genes *bar* e *SbMATE*. Durante o processo de cultura de tecidos associado com a transformação, eventos transformados foram selecionados em meio contendo o herbicida fosfinotricina. Assim, é esperado que apenas os eventos que continham o gene *bar* corretamente inserido no genoma e expressando fossem selecionados (Shou et al., 2004). Algumas vezes, o gene de interesse pode não ser expresso devido à fragmentação da construção gênica durante os processos de precipitação do DNA nas micropartículas e transformação via biobalística.

Das oito plantas T0 geradas via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, apenas cinco foram analisadas por PCR, sendo identificadas quatro contendo o gene *SbMATE* (Figura 11). No caso da transformação mediada por *A. tumefaciens* a cotransformação do gene de seleção e do gene de interesse, *SbMATE* foi de 80%. O sistema de transformação mediada por *Agrobacterium* favorece a co-integração dos genes de seleção e de interesse, uma vez que ambos estão localizados no mesmo T-DNA. Além disso, a inserção do gene *Ubi::SbMATE::NOS* junto à borda direita do vetor *pTF101* e do gene *CaMV35S::bar::Tvsp* junto à borda esquerda propicia um maior número de eventos contendo os dois genes. A transferência do T-DNA é iniciada pela borda direita (Gelvin, 2000), nesse caso quando o gene de seleção começar a ser transferido, o gene *SbMATE* já terá sido transferido. Apesar da integração dos dois genes, *bar* e *SbMATE*, ser favorecida pelo sistema de transformação mediado por *Agrobacterium*, a diferença de cotransformação entre os dois sistemas foi muito pequena.

O aparecimento de plantas transgênicas com integração diferencial dos genes de seleção e de interesse é um fato comumente observado por outros

pesquisadores durante os procedimentos de transformação via biobalística ou *Agrobacterium* (Brandão, 2007).

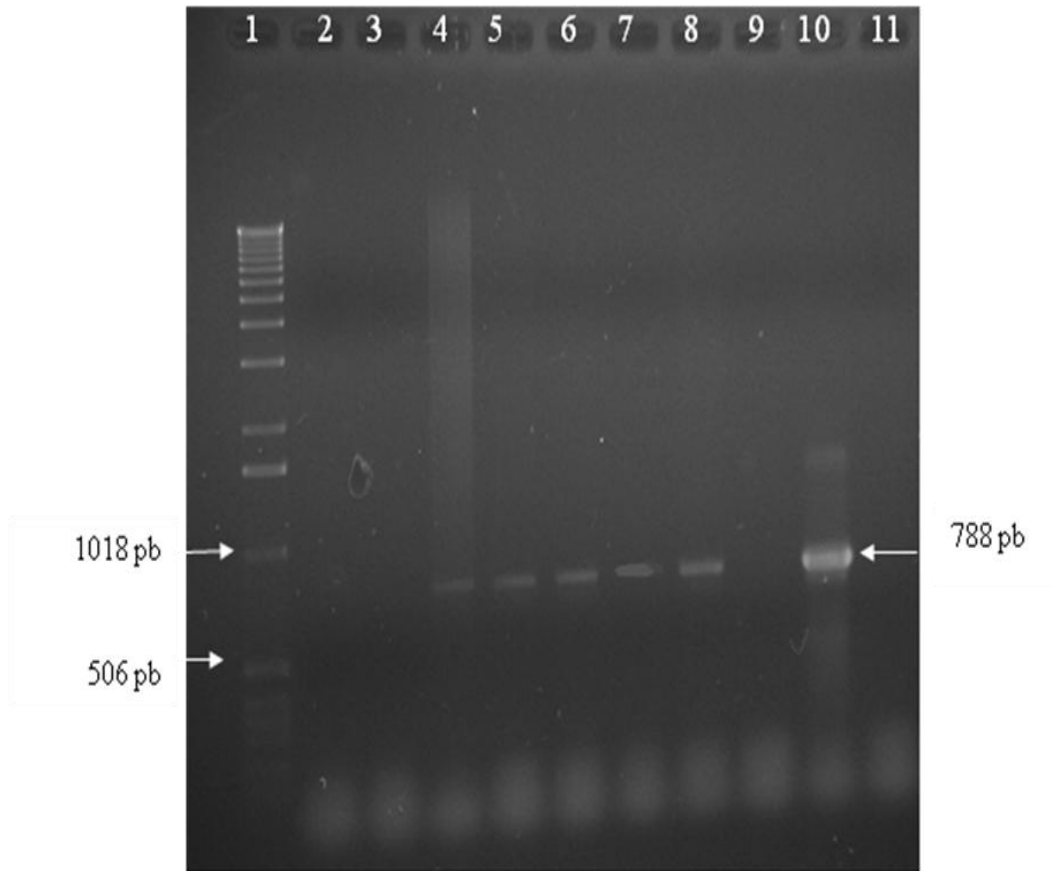


FIGURA 11 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR das plantas T0 transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* utilizando os *primers* JL57F e JL58R; (1) MM 1Kb lambda; (2,3) Milho não transgênico; (4 a 8) Eventos regenerados; (9) Eventos regenerados e negativo para o gene *SbMATE* (10) Plasmídeo *pCAMBIA 3301/Ubi::SbMATE::NOS* diluído 1:100. (11) Branco.

#### 4.3.1.2 Plantas T1

Posteriormente, um subgrupo de 15 plantas T1, selecionadas com relação à tolerância ao AI (seção 3.7), foi também caracterizado molecularmente.

Na primeira geração das plantas (T1), o produto da PCR (Figura 12) foi amplificado em 11 eventos, pois nessa geração já começa surgir a segregação dos genes de interesse e de seleção, mas eles ainda não se encontram fixados. Nos eventos transformados via *Agrobacterium*, o gene *SbMATE* foi amplificado em sete plantas (87,5%), e pela técnica de biobalística foram amplificado em quatro plantas (57,14%).

O mesmo ocorreu na confirmação do gene *bar* comparando-as com as T0 (Figura 13), foi possível a amplificação com sucesso desse gene em 12 plantas e em apenas 3 foram negativas, sendo esse resultado justificado pela segregação gênica.

Sasaki et al. (2004) confirmaram em 100% das plantas T0 analisadas, a presença do gene *ALMT1* em plantas transgênicas de arroz através de PCR.

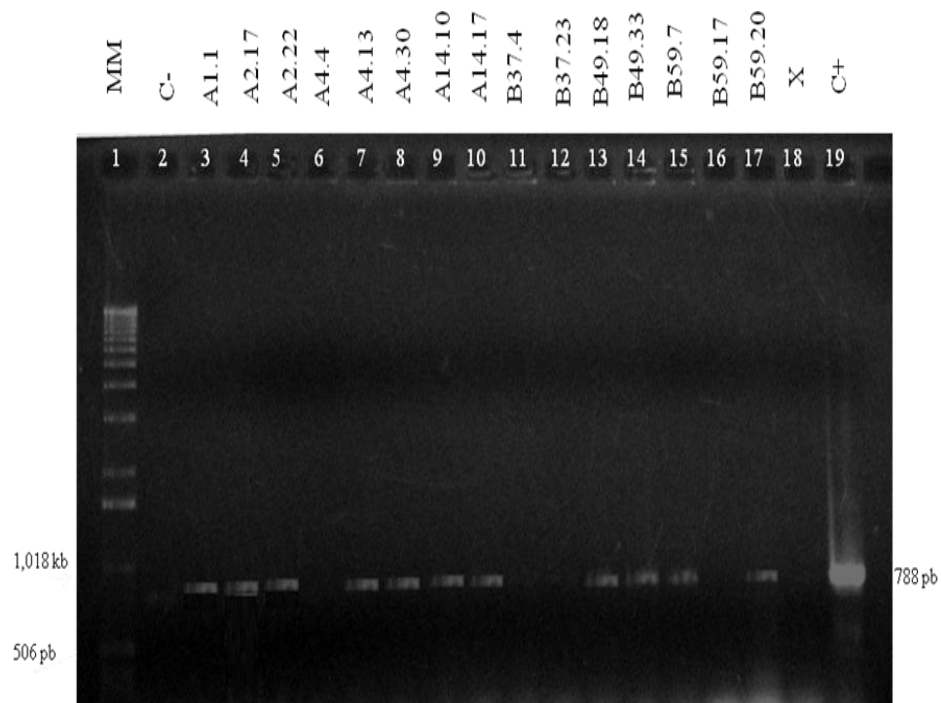


FIGURA 12 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR das plantas T1 para o gene *SbMATE* com os primers JL57F e JL58R; Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo planta de milho não transgênica; (3, 4, 5, 7, 8, 9 10, 13, 14, 15, 17) Plantas positivas; (6, 11,12,16) Plantas negativas para a presença do gene *SbMATE*; (18) Branco; (19) Controle positivo plasmídeo *Ubi::SbMATE::NOS*. Os eventos com a inicial **A** e **B** são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente.

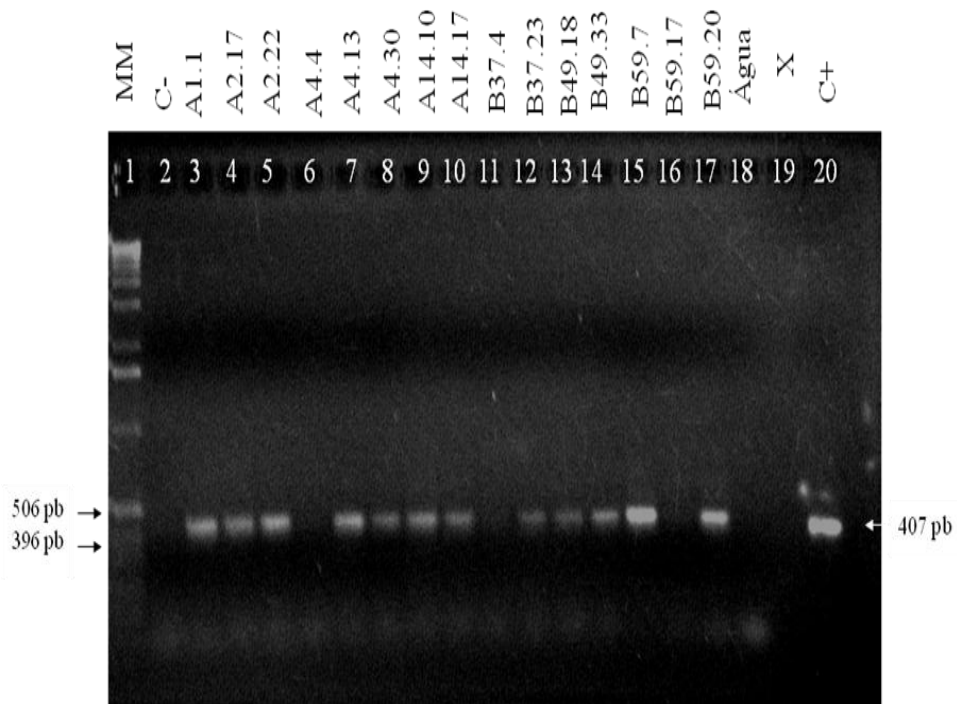


FIGURA 13 Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, referente à PCR de plantas T1 para o gene *bar* amplificado com os primers *barF* e *barR*; Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo; (3, 4, 5, 7, 8, 9 10, 12, 13, 14, 15, 17) Plantas positivas; (6, 11, 16) Plantas negativos; (18) Branco; (20) Controle positivo plasmídeo *Ubi::bar::NOS*. Os eventos com a inicial **A** e **B** são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente.

A análise de PCR não é uma técnica aceita como prova final de transgenia devido a sua alta sensibilidade, podendo gerar falsos positivos. Pequenas quantidades de DNA contaminante, contendo o gene analisado podem ser amplificadas (Romano, 1998). Nesse caso, optamos para confirmação dos resultados de PCR, o uso de *Southern blotting* do DNA genômico das plantas transgênicas.

#### 4.3.2 Análise da presença do gene *SbMATE* por *Southern blotting*

A presença do gene *SbMATE* foi confirmada em seis de oito amostras de DNA digeridas com a enzima *EcoRI* provenientes da transformação via *Agrobacterium* (Figura 14).

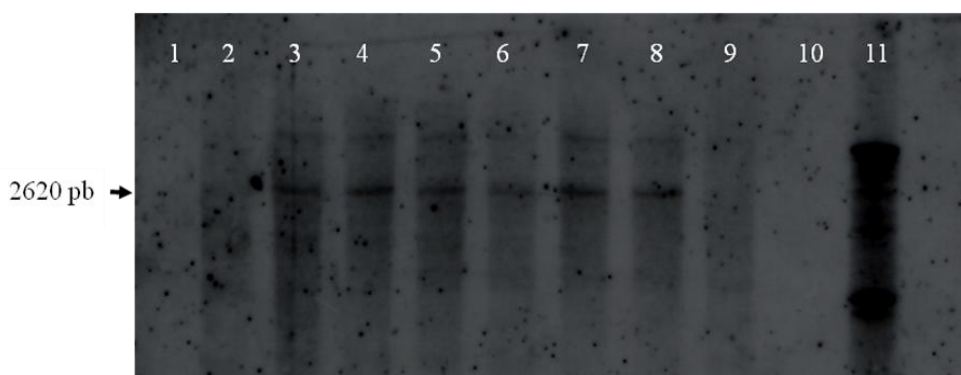


FIGURA 14 *Southern blot* de plantas T0 transformadas via *Agrobacterium*. 30  $\mu$ g de DNA genômico foram digeridos com *EcoRI* e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar presença do gene. Canaletas (1) MM 1Kb lambda; (2) Controle negativo planta de milho não transgênica; (3, 4, 5, 6, 7, 8) Plantas positivas; (9) Plantas negativas; (11) Plasmídeo *Ubi::SbMATE::NOS*.

Para os sete eventos derivados do bombardeamento de partículas, e os oito derivados de *Agrobacterium*, o fragmento de 2,620 Kb (Figura 2) confirmando a presença do gene, foi detectado nos eventos analisados (Figura 15).



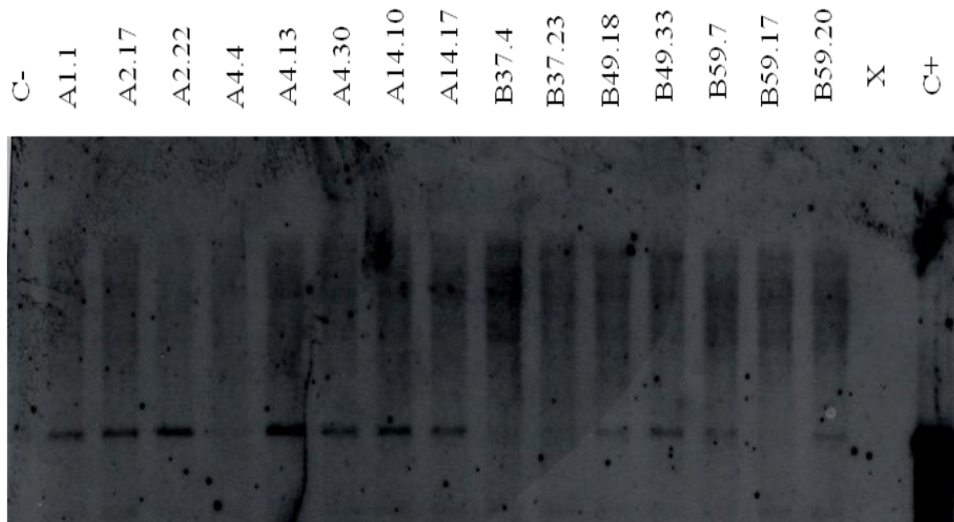


FIGURA 15 *Southern blot* dos eventos T1 transformadas via *Agrobacterium* e biobalística. 30  $\mu$ g de DNA genômico foram digeridos com *EcoRI* e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar presença do gene. (C-) Controle negativo; (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) Evento segregado positivo gerado via transformação mediada *Agrobacterium*; (11, 12, 13, 15) Evento segregado positivo gerado via transformação mediada biobalística; (4, 9, 10, 14) Evento segregado negativo; (x) Branco; (C+) Plasmídeo *pCAMBIA 3301/Ubi::SbMATE::NOS* diluído 1:500. Os eventos com a inicial **A** e **B** são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente.

O número de cópias foi estimado digerindo os DNAs com a enzima de restrição *HindIII*, que corta apenas uma vez dentro da construção. O resultado desse *Southern blot* não foi muito satisfatório, apesar de ter sido repetido. Entretanto, é possível perceber que a maioria dos eventos gerados via *Agrobacterium* tem uma única cópia ou menos cópias do transgene quando comparado à transformação via biobalística (Figura 16). Dados similares, mostrando que a transformação mediada por *Agrobacterium* resulta em um

número de cópias mais baixo do que a transformação via biobalística, têm sido apresentados por diferentes pesquisadores (Daí et al., 2001; Shou et al., 2004; Zhao et al., 1998). Teoricamente a transformação via biobalística é capaz de introduzir múltiplas cópias do transgene no genoma transformado, enquanto que na transformação mediada por *Agrobacterium* a maioria dos eventos contém entre uma a quatro cópias do transgene (Hansen et al., 1996; Shou et al., 2004).

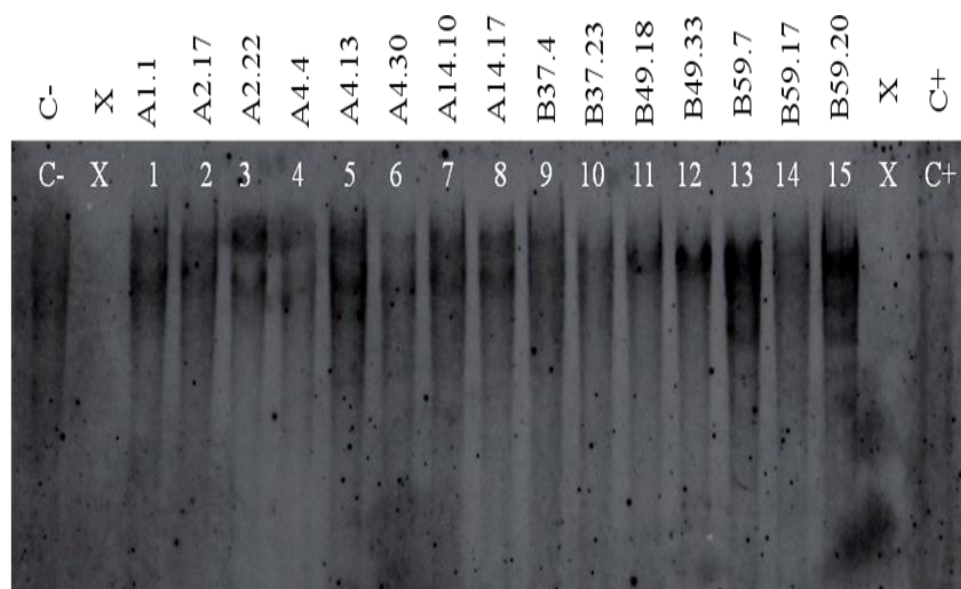


FIGURA 16 *Southern blot* dos eventos T1 transformadas via *Agrobacterium* e biobalística. 30  $\mu$ g de DNA genômico foram digeridos com *Hind*III e marcado com a sonda *SbMATE* para identificar o número de cópias do gene. (C-) Controle negativo; (x) branco; (1 a 8) eventos gerados via *Agrobacterium*; (9 a 15) eventos gerados via biobalística; (C+) Plasmídeo *Ubi::SbMATE::NOS* diluído 1:500. Os eventos com a inicial **A** e **B** são referentes à transformação mediada via *Agrobacterium tumefaciens* e biobalística, respectivamente.

#### **4.4 Análises da expressão gênica**

##### **4.4.1.1 Crescimento radicular de genótipos de milho não transgênico em solução nutritiva com diferentes doses de Al**

A tolerância ao Al pode ser avaliada através da determinação de alongamento das raízes das plantas crescidas em cultivo hidropônico, na presença contínua de Al adicionado (Alves et al., 2004).

O híbrido Hi II foi o milho utilizado para a superexpressão do gene *SbMATE* principalmente por ser um genótipo de fácil manutenção em cultura de tecidos e transformação menos recalcitrante. Entretanto, não existe na literatura nenhuma referência à sua tolerância ao estresse de  $Al^{+3}$ , portanto foi necessária a realização de experimentos com essa finalidade.

Alves et al. (2004) sugerem que a tolerância ao alumínio em milho é melhor caracterizada na concentração de 222  $\mu M$  de Al ou {39}  $\mu M$ , permitindo uma melhor distribuição entre os materiais tolerantes e sensíveis. Nessa atividade, as linhagens L1154 e L3 apresentam pequena redução no crescimento da raiz seminal, 18,7% e 4,3%, respectivamente. Sendo considerados genótipos mais tolerantes ao estresse de alumínio. Já a linhagem L53 tem o crescimento da raiz seminal completamente inibido nessa atividade de alumínio, sendo considerado um genótipo sensível.

O crescimento radicular em solução hidropônica, suplementada com  $Al^{+3}$ , do híbrido Hi II e seus progenitores, linhagem Parental A e Parental B foi comparado com o crescimento seminal do genótipo tolerante L3 nas atividades de 27, 39 e 60  $\mu M$  de Al e concentrações 148, 222, 360  $\mu M$  de Al, respectivamente. As médias de Crescimento Líquido Relativo (CRL) obtidas foram comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey com nível de significância 5% (Anexo I).

TABELA 2 Porcentagem de crescimento líquido relativo (CLR) de 4 genótipos de milho expostas às atividades de {27}, {39}, e {60}  $\mu\text{M}$  de Al em solução nutritiva.

Genótipos de Milho	CLR (+Al/-Al)		
	{27} $\mu\text{M}$ Al	{39} $\mu\text{M}$ Al	{60} $\mu\text{M}$ Al
Parental A	73.626808 a	72.560055 a b	43.897635 a
Hi-II	76.842041 a	64.859751 a	47.202598 a
L3	91.525531 a	68.811840 a b	52.559477 a
Parental B	107.064352 a	103.468461 b	62.339123 a

Valores representam médias de três repetições. Médias dentro de colunas com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados da Tabela 2 demonstram a existência de variabilidade quanto aos níveis de tolerância ao Al entre os genótipos de milho analisados. Não foi detectada uma diferença significativa entre os genótipos quanto ao CLR nas atividades de 27 e 60  $\mu\text{M}$  Al. Na atividade {27}  $\mu\text{M}$  de Al, o CRL foi estaticamente igual para todos os genótipos, sendo que a inibição do crescimento radicular variou entre 8,48% a 26,37% para L3 e Hi II, respectivamente, e foi observado um estímulo do crescimento radicular para o Parental B. Com o aumento da atividade de Al para {60}  $\mu\text{M}$ , o CRL continuou estaticamente igual para todos os genótipos, foi observado uma inibição de crescimento radicular que variou entre 56,1% a 37,66% para os genótipos testados. Diferenças estatísticas de CRL foram detectadas apenas na atividade 39  $\mu\text{M}$  Al, onde o Parental B apresentou uma tolerância mais elevada, enquanto que o híbrido Hi II foi menos tolerante.

Esse experimento mostrou que existe uma tolerância moderada do híbrido Hi II ao estresse de  $\text{Al}^{+3}$ , comparável à tolerância apresentada pela

linhagem L3. Essa tolerância, provavelmente, foi herdada do Parental B que apresentou uma maior tolerância em concentrações tóxicas de Al. Também mostrou que a atividade 60  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{+3}$  poderia ser utilizada para a análise em solução hidropônica das plantas transgênicas geradas, pois nesta solução está ocorrendo uma inibição de mais de 45% do crescimento radicular das plantas Hi-II não transformadas.

Apesar da tolerância ao alumínio ser uma variável de distribuição contínua, que depende fundamentalmente do nível de tolerância dos genótipos e das doses de Al, foram estabelecidas classes de tolerância definidas com base nos valores de %CLR (Crescimento Líquido Relativo) na atividade de 60  $\mu\text{M}$  de Al, para melhor classificar os genótipos.

TABELA 3 Classificação da porcentagem de indivíduos dos genótipos de milho não transgênico sob o estresse de {60}  $\mu\text{M}$  de Al em solução hidropônica.

Genótipos	Número de plantas analisadas	%CRR			
		Sensível	Moderadamente tolerante	Tolerante	Altamente tolerante
		%CRR $\leq$ 30	30 < %CRR $\leq$ 50	50 < %CRR $\leq$ 100	%CRR $\geq$ 100
Parental A	14	0%	78,6%	21,4%	0%
Parental B	14	0%	50%	41,7%	8,3%
L3	7	0%	28,6%	71,4%	0%
Hi-II	14	0%	71,4%	28,6%	0%

A Tabela 3 indica que nesse experimento, os genótipos L3 e Parental B foram considerados tolerantes, devido a uma maior porcentagem de indivíduos na faixa de CRR entre 50 à 100%. Os genótipos Hi II e Parental A foram

caracterizados como moderadamente tolerantes, apresentando um maior número de indivíduos na faixa de CRR entre 30 e 50%.

#### **4.4.2 Crescimento radicular nos genótipos de milhos transgênicos em {60} $\mu\text{L}$ de Al**

Todas as sementes T1 produzidas pelos 47 eventos de milho transformados com a construção *Ubi::SbMATE::NOS*, 8 eventos gerados por transformação mediada por *Agrobacterium* e 39 via biobalística, foram germinadas e submetidas ao estresse de  $\text{Al}^{+3}$  conforme descrito em Material e Métodos.

A Tabela 4 retrata a porcentagem de indivíduos de cada evento quanto ao seu CRR, possibilitando diferenciar os eventos mais tolerantes dos menos tolerantes. Foi utilizado para comparar os diferentes eventos gerados a %CRR ao invés de %CLR porque não foi possível a adoção de um controle independente, uma vez que cada indivíduo da população representa um genótipo distinto.

De acordo com os dados apresentados, todos os eventos transgênicos produzidos tiveram um maior número de indivíduos categorizados nas classes moderadamente tolerante e tolerante, quando comparados com os genótipos controle, os quais tiveram a maioria dos indivíduos caracterizados como moderadamente tolerante com exceção da linhagem sensível L53. Também é possível visualizar na Figura 17 o aspecto de cada raiz, diferenciando-as quanto a sua tolerância. A partir dessas análises foi possível estabelecer um critério para uma primeira avaliação molecular, quanto a presença e expressão do gene *SbMATE*.



FIGURA 17 Aspectos visuais de raízes de genótipos sensíveis (S), moderadamente tolerante (M), tolerante (T) e altamente tolerante (A) na presença {60}  $\mu\text{M}$  de alumínio.

TABELA 4 Relação da porcentagem de indivíduos T1 quanto a sua tolerância em solução nutritiva hidropônica suplementada com {60} µM de Al. A relação do número de plantas analisadas em cada evento, está exposta na Tabela 1.

Genótipos	%CRR			
	Sensível	Moderadamente tolerante	Tolerante	Altamente tolerante
	%CRR ≤ 30	30 < %CRR ≤ 50	50 < %CRR ≤ 100	%CRR ≥ 100
*Hi-II	31,7%	58,5%	9,8%	0%
*L3	14,3%	76,2%	9,5%	0%
*Parent A	19%	57%	24%	0%
*Parent B	9,5%	57,1%	28,6%	4,8%
*L53	95,2%	4,8%	0%	0%
A1	0%	50%	50%	0%
A2	14,3%	50%	25%	10,7%
A4	9,5%	28,6%	57,1%	4,8%
A5	11,1%	33,3%	50%	5,6%
A8	16%	20%	48%	16%
A14	4,5%	13,6%	68,2%	13,7%
A19	15,6%	31,3%	53,1%	0%
A25	14,3%	66,7%	19%	0%
B4	0%	60%	40%	0%
B5	35,7%	35,7%	28,6%	0%
B7	0%	0%	100%	0%
B19	25%	50%	25%	0%
B20	0%	50%	50%	0%
B22	10%	30%	60%	0%
B21	35,3%	47,1%	17,6%	0%
B24	12,5%	75%	12,5%	0%
B25	39,1%	39,1%	21,8%	0%
B26	50%	0%	50%	0%
B27	75%	12,5%	12,5%	0%
B29	28,6%	28,6%	42,8%	0%
B30	0%	100%	0%	0%
B33	5,5%	38,9%	55,6%	0%
B35	7,4%	44,4%	48,2%	0%
B34	52,6%	44,8%	2,6%	0%
B36	0%	0%	100%	0%
B37	8%	52%	40%	0%
B38	8,3%	50%	41,7%	0%
B39	7,1%	42,9%	50%	0%
B40	27,3%	54,5%	18,2%	0%
B42	20%	10%	70%	0%
B43	25%	43,7%	31,3%	0%
B44	23,5%	50%	26,5%	0%
B49	5,5%	52,8%	41,7%	0%
B52	0%	37,5%	62,5%	0%



“TABELA 4, Cont”.

B53	100%	0%	0%	0%
B54	0%	100%	0%	0%
B55	50%	0%	50%	0%
B56	0%	100%	0%	0%
B57	33,3%	66,7%	0%	0%
B58	100%	0%	0%	0%
B59	0%	34,4%	65,6%	0%
B60	0%	100%	0%	0%
B61	50%	50%	0%	0%
B64	0%	33,3%	66,7%	0%
B65	8,7%	52,2%	39,1%	0%
B66	11,1%	22,2%	66,7%	0%
B67	41,7%	41,7%	16,6%	0%

\*Controles não transgênicos. Foram utilizadas pelo menos 21 sementes de cada genótipo.

\*Números precedidos pela letra A correspondem a eventos gerados via *Agrobacterium* e pela letra B via biobalística.

Foi observado em eventos gerados via transformação mediada por *Agrobacterium* e via biobalística, uma diferença no número de indivíduos distribuídos nas diferentes classes de sensibilidades ao estresse de Al<sup>+3</sup>. Na transformação por *Agrobacterium*, houve uma maior porcentagem de indivíduos tolerantes e com melhores níveis de tolerância. Quando esses eventos foram comparados com os controles não transgênicos Hi II e Parentais A e B, 75% dos eventos produziram um número superior de indivíduos classificados como tolerantes. Sendo que nos eventos A2, A4, A5, A8 e A14 foram obtidos 10,7%, 4,8%, 5,6%, 16%, e 13,7% indivíduos altamente tolerantes, respectivamente. Nos eventos via biobalística, um maior número de indivíduos foi classificado nas classes moderadamente tolerante e tolerante, sendo que não foram identificados indivíduos altamente tolerantes. Ainda, entre os 39 eventos testados, 6 tiveram um maior número de indivíduos sensíveis ao estresse de Al<sup>+3</sup> (B26, B27, B34, B53, B58 e B61). Quando esses eventos foram comparados com os controles não transgênicos Hi II e Parentais A e B, 53,8% dos eventos produziram um número superior de indivíduos classificados como tolerantes.

A média geral de %CRR dos indivíduos testados, de cada evento, em solução nutritiva suplementada com  $Al^{+3}$  é apresentada na Figura 18. O gráfico mostra que os eventos obtidos através de transformação-mediada por *Agrobacterium* possuem um maior crescimento da raiz seminal do que os eventos derivados da biobalística. Essas observações foram verificadas em dados de diferentes autores trabalhando com transformação mediada por *Agrobacterium* versus biobalística (Daí et al., 2001; Zhao et al., 1998; Shou et al., 2004; Assem et al., 2008). Shou et al. (2004) mostraram que o gene *NPK1* é mais expresso em eventos de milho gerados através de *Agrobacterium* quando comparados com eventos produzidos via biobalística. Também, Assem et al. (2008) comparando os dois sistemas de transformação, mostraram que o gene *bar* foi expresso mais eficientemente em plantas de milho transformadas via *Agrobacterium*.

Todas as plântulas com CRR acima ou igual à média de sua progênie, com um crescimento radicular saudável e ápices bem formados foram selecionadas e transferidas para a casa de vegetação para produção de sementes. Um subgrupo de 15 dessas plantas, foram selecionadas para análises de expressão do transgene *SbMATE* (Tabela 5). Essa seleção teve como base os dados de %CRR (Figura 20), bem como observações visuais do vigor de crescimento da raiz e do ápice radicular.

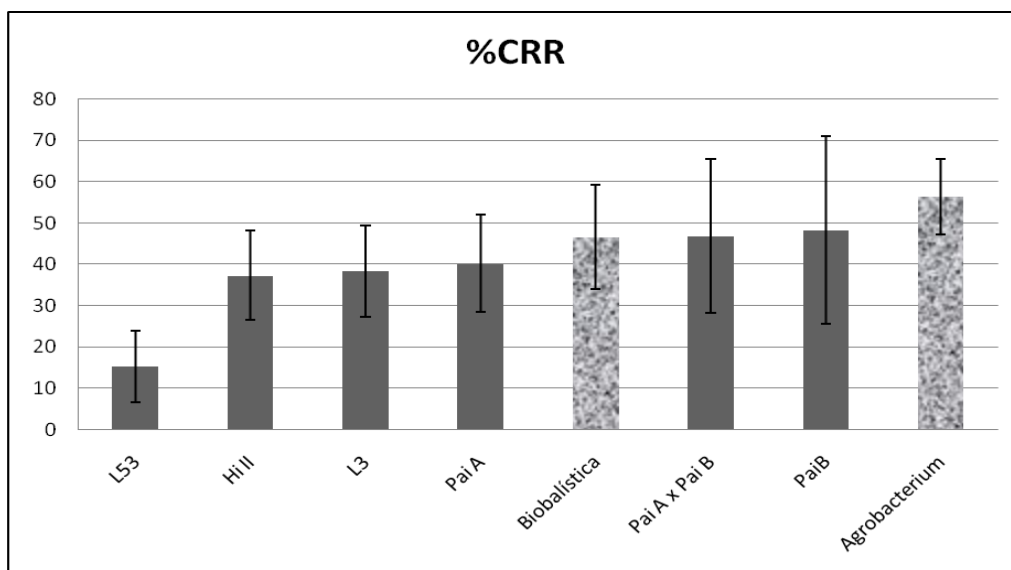


FIGURA 18 Comparação das médias das %CRR entre os eventos transgênicos obtidos via *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística e não transgênicos. L53: linhagem tropical sensível ao  $Al^{+3}$ ; Hi II híbrido temperado utilizado na transformação genética (F2); L3: linhagem tropical com tolerância mediana ao  $Al^{+3}$ ; A: parental A do híbrido Hi II; B: parental B do híbrido Hi II; Biobalística: média de 39 eventos obtidos via biobalística; *Agrobacterium*: média de oito eventos obtidos via transformação mediada por *Agrobacterium*.

TABELA 5 Indivíduos selecionados baseados no aspecto visual da raiz e CRR%, caracterizado quanto a sua tolerância em níveis tóxicos de Al.

Nível de tolerância ao Al	Parâmetro	Plantas individuais
Sensível	$\%CRR \leq 30$	
Moderadamente tolerante	$30 < \%CRR \leq 50$	A4.4, A4.13, B37.4, B59.7, B59.17
Tolerante	$50 < \%CRR \leq 100$	A1.1, A2.17, A2.22, A14.10, A14.17, B37.23, B49.18, B49.33, B59.20
Altamente tolerante	$\%CRR \geq 100$	

A análise de variância (Anexo J) dos valores de CRR% e a comparação de todos os eventos, usando o Teste de Tukey com nível de significância 5% de probabilidade foram realizadas para todos os indivíduos de cada evento descrito na Tabela 4 submetida à atividade de {60}  $\mu\text{M}$  Al em solução nutritiva, com o auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000). Nessa análise, foi possível comparar as diferença entre o método utilizado para transformação (*Agrobacterium* ou biobalística) e o tipo (transgênico ou não transgênico).

Foi detectada uma diferença significativa entres os genótipos, sendo que o que mais demonstrou sensibilidade ao alumínio foi o genótipo L53 (não transgênico), o que já era esperado e, o que demonstrou uma tolerância maior foi o genótipo B7 (transgênico), demonstrando que a transformação genética utilizada foi eficiente, principalmente, comparando ao mesmo genótipo não transformado (Hi II).

Os genótipos transformados foram mais tolerantes significativamente que os não transformados. Existe uma diferença significativa entre os dois tipos de transformação, e neste trabalho o método *Agrobacterium tumefaciens* foi mais eficiente quanto à tolerância ao alumínio em solução hidropônica utilizando atividade {60}  $\mu\text{M}$  de Al.

A média calculada dos genótipos transformados foi, estatisticamente, igual a dos genótipos mais tolerantes a alumínio, indicando que o genótipo Hi II atendeu a transformação, ou seja, ele passou a ser mais tolerante ao Al que o genótipo Hi II, L53, L3 e parental A, que foram os que apresentaram maior sensibilidade ao alumínio utilizando atividade {60}  $\mu\text{M}$  de Al.

Para a transformação genética de Hi II utilizando o gene *SbMATE* os resultados do teste de  $\chi^2$  apresentaram ajuste dos dados de distribuição de frequência dos valores de CRR nas progênies T1 a um modelo normal, fornecendo indício de herança mendeliana 1:3 (Sensíveis:Tolerante), 85% das famílias analisadas (Tabela 6) apresentam valores aceitos pelo teste de  $\chi^2$

( $P < 5\%$ ). Essa possível complexidade poderia ser atribuída, dentre outros fatores, à tolerância natural desse genótipo, determinada pela presença de mais de um gene de tolerância doado pelos parentais tolerantes ou pela presença de gene(s) de tolerância em Parental B.

A correlação entre expressão do gene e crescimento radicular foi baixa ( $R^2 = 0,354928$ ), porém ela foi maior quando os tipos de transformação são comparados onde as plantas transformadas via Biobalística tem um  $R^2 = 0,571928$ . Isso pode ser justificado devido a uma variação intrínseca de genes que tenham algum efeito quanto à tolerância ao alumínio.

O arroz é a espécie de cereal mais tolerante ao Al, e a expressão de *ALMT1* em arroz não foi aumentada em plantas transgênicas, sendo justificado pela quantidade de malato liberado não sendo suficiente para aumentar a tolerância ao Al do transformante acima do elevado nível endógeno de tolerância (Sasaki et al., 2004). Células de tabaco superexpressando o gene *ALMT1* mostram um aumento da tolerância ao Al (Sasaki et al., 2004).

Em cevada transgênica expressando o gene *TaALMT1* mostrou um crescimento radicular semelhante quando cultivado por 5 dias em solos ácidos, e no mesmo solo, o crescimento das raízes das linhagens não transgênicas, bem como o tipo selvagem da cultivar parental, foi inibido por cerca de 30% em relação ao transgênicos (Delhaize et al., 2009). Todos os genótipos apresentaram comprimento de raiz semelhante quando avaliados em hidroponia e em solos ácidos. Em hidroponia, a tolerância ao Al em cevada expressando o *ALMT1* pode ser avaliada através do crescimento vigoroso e do alongamento radicular na presença contínua de Al, enquanto que, em linhagens não transgênicas, o crescimento radicular foi fortemente inibido (Delhaize et al., 2004).

TABELA 6 Teste de  $\chi^2$  quanto a distribuição de frequência dos valores de %CRR nas progênies T1 a um modelo normal, fornecendo indício de herança mendeliana 1:3 (Sensível:Tolerante).

Família	Esperado	Esperado	Observado	Observado	Soma $\chi^2$	GL
2	7	21	4	24	1,714286	1
A4	5,25	15,75	2	19	2,68254	1
A5	4,75	14,25	2	17	2,122807	1
A8	6,25	18,75	4	21	1,08	1
A14	5,75	17,25	1	22	5,231884	*1
A19	8	24	5	27	1,5	1
A25	5,75	17,25	5	18	0,130435	1
B4	1,25	3,75	0	5	1,666667	1
B5	3,5	10,5	5	9	0,857143	1
B19	1	3	1	3	0	1
B22	2,5	7,5	1	9	1,2	1
B21	4,25	12,75	6	11	0,960784	1
B24	2	6	1	7	0,666667	1
B25	5,75	17,25	9	14	2,449275	1
B27	1,25	3,75	3	2	3,266667	1
B29	1,75	5,25	2	5	0,047619	1
B33	4,5	13,5	1	17	3,62963	1
B35	6,75	20,25	2	25	4,45679	*1
B34	9,5	28,5	20	18	15,47368	*1
B37	6,25	18,75	2	15	3,64	1
B38	3	9	1	11	1,777778	1
B39	3,5	10,5	1	13	2,380952	1
B40	2,5	7,5	3	7	0,133333	1
B42	2,5	7,5	2	8	0,133333	1
B43	4	12	4	12	0	1
B44	8,5	25,5	8	26	0,039216	1
B49	9	27	2	34	7,259259	*1
B52	2,25	7,75	0	9	2,451613	1
B59	8	24	0	32	10,66667	*1
B61	1	3	2	2	1,333333	1

...Continua...

“TABELA 6, Cont”.

B65	5,75	17,25	2	21	3,26087	1
B66	2,25	7,75	1	8	0,702509	1
B67	6	18	10	14	3,555556	1

\*Valor não significativo quanto a segregação das famílias analisadas pelo teste de  $\chi^2$  ( $P < 5\%$ ).

#### 4.4.3 Quantificação da expressão do gene *SbMATE* por PCR em tempo real

A expressão do gene *SbMATE* em algumas das plantas transgênicas geradas foi analisada através de PCR em tempo real. Para normalizar a expressão do gene *SbMATE* comparou-se plantas transgênicas com não transgênicas e com a linhagem BR007 de sorgo sensível ao Al.

Para a correção de possíveis variações na quantidade de RNA inicial utilizada em cada reação, assim como variações decorrentes da pipetagem manual dos reagentes, optou-se pela normalização dos experimentos utilizando o gene endógeno da actina do milho (Bustin et al., 2005). Dessa maneira, a quantificação da expressão do gene *SbMATE* foi descrita em valores de  $\Delta$ CT.

A PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão do gene *SbMATE* em plantas T0 geradas da transformação mediada via *Agrobacterium* (5 eventos) e também utilizada em subgrupo de plantas T1 produzidas via biobalística (7 eventos) e *Agrobacterium tumefaciens* (8 eventos).

Dentre as plantas T0 (Figura 19) analisadas, 80% foram positivas para a expressão do gene *SbMATE* quando comparadas com o controle negativo, planta isogênica não transgênica. As plantas positivas podem ser consideradas estatisticamente iguais quanto a sua expressão, chegando a expressar o gene *SbMATE* até 34.000 x comparada ao controle negativo.

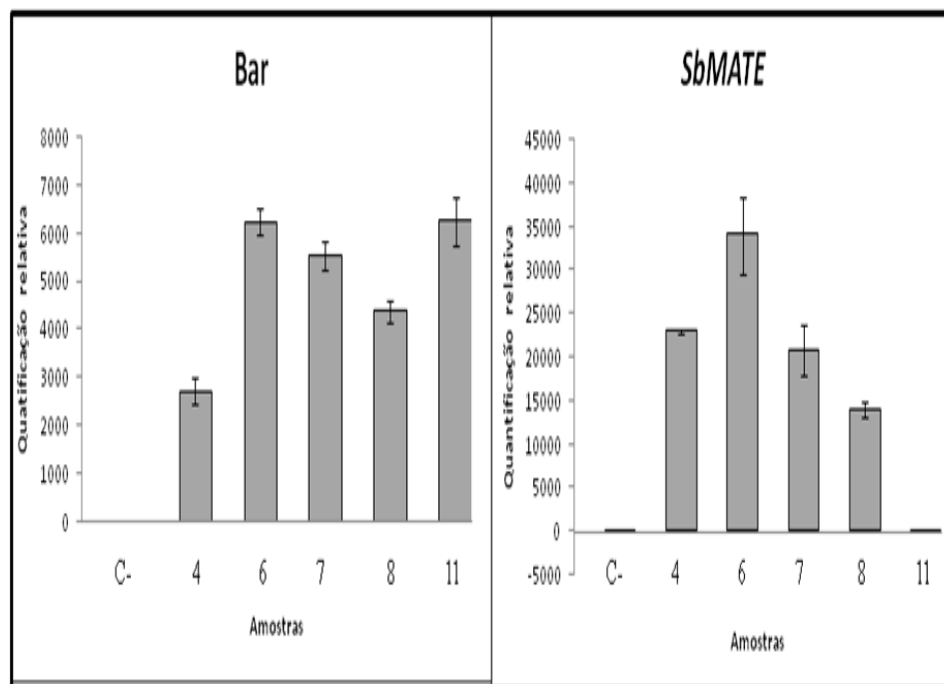


FIGURA 19 Expressão do transgene *Ubi::SbmMATE::NOS* em plantas T0 (transformadas via *Agrobacterium*) utilizando Real Time PCR/*SyberGreen*. (A) Expressão do gene *bar*. Amostras 4, 6, 7, 8,11: plantas positivas; 1, controle negativo planta não transgênica; (B) Expressão do gene *SbmMATE*. Amostras 4, 6, 7, 8: plantas positivas; 11 planta positiva para o gene *bar* e negativa para o gene *SbmMATE*; C-, controle negativo planta não transgênica.



Dentre as plantas T1 analisadas (Figura 20), é possível observar a expressão do gene *SbMATE* em todas as plantas, porém com uma faixa de variação entre 0,62 x (evento A4.4) até 10.429,54 x (A2.22), quando comparadas com os controles negativos. O gráfico mostra que 80% das plantas analisadas foram positivas para a expressão do gene *SbMATE*.

As plantas transformadas via *Agrobacterium* apresentam um maior número de indivíduos com maior nível de expressão. 87,5% desses indivíduos apresentam expressão superior a 480 x, destacando as plantas A2.17, A2.22, e A4.13 que são, estatisticamente, iguais quanto a sua expressão, passando de 4.200 x da expressão dos controles negativos.

As plantas produzidas via biobalística tiveram uma expressão mais baixa, sendo que o maior nível foi o da planta B49.33 com uma expressão de 1227,9 x maior do que as plantas controle. 42,9 % dessas plantas tiveram uma expressão menor que 50 x e 28,6% apresentam uma expressão de aproximadamente 300 x, quando comparadas com os controles negativos.

Os resultados das análises de PCR em Tempo Real da expressão do gene *SbMATE* ratificam os dados obtidos através da análise do crescimento da raiz seminal em meio nutritivo suplementado com Al<sup>+3</sup>. Plantas oriundas da transformação via *Agrobacterium* apresentaram um nível de expressão do transgene mais elevado do que plantas obtidas via biobalística. Diferentes publicações têm mostrado que eventos gerados via transformação mediada por *Agrobacterium* possuem um menor número de cópias do transgene quando comparados com eventos gerados via biobalística (Shou et al., 2004; Assem et al., 2008). Shou et al. (2004) mostraram que o milho transgênico produzido via *Agrobacterium tumefaciens* continha entre 1 e 10 cópias do gene *NPK1*, sendo que 96% dos eventos tinham menos de 3 cópias. Em contraste, nesse mesmo trabalho, os eventos produzidos por biobalística tinham entre 1 e 277 cópias do mesmo gene. Esses autores mostraram também que os eventos contendo um

menor número de cópias do transgene possuíam um nível de expressão mais elevado. Vários outros trabalhos têm mostrado uma correlação inversa entre número de cópias e expressão do transgene (Vaucheret et al., 1998; Fagard et al., 2000; Daí et al., 2001), o que suporta o argumento de que um número alto de cópias do transgene pode ocasionar supressão ou silenciamento gênico. No nosso trabalho, ainda não foi possível conseguir uma quantificação exata do número de cópias presente em cada evento estudado, entretanto o *Southern blot* de número de cópias apresentado (Figura 16) sinaliza para um resultado onde as plantas geradas via *Agrobacterium* possuem um menor número de cópias do transgene, o que estaria em concordância com os resultados obtidos por outros pesquisadores.

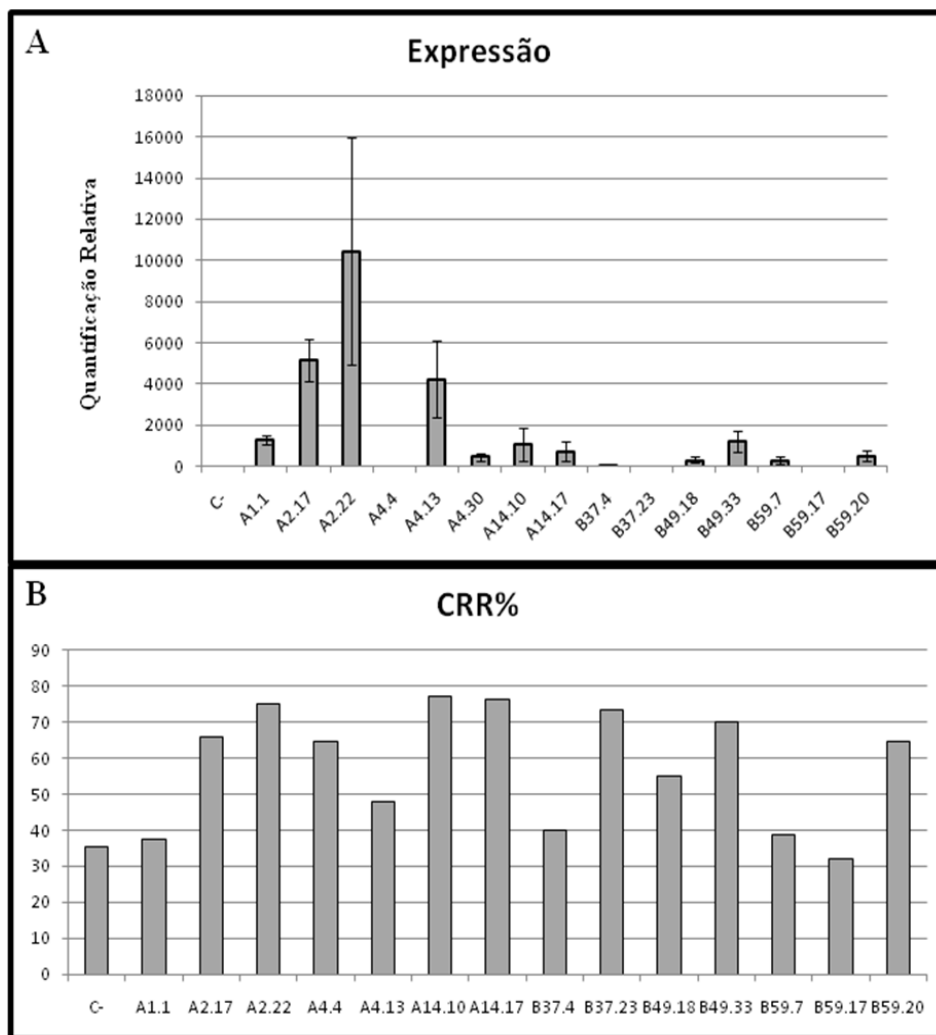


FIGURA 20 Expressão do gene *SbmMATE* em plantas transgênicas de milho (T1). **(A)** Quantificação relativa do gene *SbmMATE* utilizando Real Time PCR/SyberGreen. (C-) Controle negativo planta não transgênica; Eventos A4.4, B37.4, B37.23 e B59.17: plantas negativas; Eventos A1.1, A2.17, A4.13, A4.30, A14.10, A14.17, B49.18, B49.33, B59.7, B59.20: Plantas positivas. **(B)** Distribuição da %CRR das plantas selecionadas para análise molecular.

## 5 CONCLUSÕES

Foram geradas plantas de milho contendo a construção gênica *Ubi::SbMATE::NOS* via biobalística e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

A presença do gene *SbMATE* nas plantas produzidas foi confirmada através de PCR e *Southern blot*.

Análise de PCR em tempo real mostrou a superexpressão do gene *SbMATE* nos eventos transgênicos quando comparados com os controles negativos.

Há uma variabilidade para a tolerância ao alumínio entre os genótipos transformados de milho avaliadas em solução hidropônica {60}  $\mu\text{M}$  de Al. As médias de %CRR de sementes T1 provenientes dos diferentes eventos, em solução nutritiva completa acrescida de Al, foram superiores às obtidas para a cultivar isogênica não-transgênica. Esses resultados inicialmente obtidos indicam que possivelmente a superexpressão do gene *SbMATE* em plantas transgênicas de milho corrobora para uma maior tolerância das plantas transgênicas ao estresse alumínio.

Diferentes respostas foram observadas na expressão do gene *SbMATE* via PCR em tempo real e crescimento radicular quando comparados os diferentes métodos de transformação. A expressão do gene *SbMATE* em plantas geradas via transformação mediada por *Agrobacterium* foi estatisticamente superior à expressão de plantas produzidas via Biobalística, sendo a transformação mediada por *Agrobacterium* o método sugerido para futuras transformações do milho.

Os dados obtidos neste trabalho são de grande importância, pois será possível analisar plantas da geração T2 quanto à presença e número de cópias

desse gene, à expressão do gene *SbMATE*, à tolerância das plantas produzidas a concentrações tóxicas de  $Al^{+3}$  e à estabilidade do transgene *Ubi::SbMATE::NOS* no genoma da planta transformada.

## 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**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 311-318, maio/ago. 2004.

ANIOL, A. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant and Soil**, The Hague, v. 123, n. 2, p. 223-227, Apr. 1990.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 207-214, Feb. 1985.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germplasm with high type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 65, p. 92-93, June 1991.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR**. Foster City, 2004. Disponível em: <<http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search.htm>>. Acesso em: 1 fev. 2010.

APPLIED BIOSYSTEMS. **RT-PCR: the basics**. Foster City, 2010. Disponível em: <<http://www.ambion.com/techlib/basics/rtpcr/index.html>>. Acesso em: 5 fev. 2010.

ARAGÃO, F. J. L.; BARROS, L. M.; VALLE, M.; GANDER, E. S.; RECH, E. L. Expression of a methionine gene isolated from Brazil nut in transgenic bean plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p. 445-451, June 1999.

ARAGÃO, F. J. L.; RIBEIRO, S. G.; BARROS, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M.; MAXWELL, D. P.; RECH, E. L.; FARIA, J. C. Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs showed delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic vírus. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 4, n. 6, p. 491-499, Dec. 1998.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells results in the recovery of transgenic soybean plants at high frequency. **Theoretical and Applied Genetics** : international journal of plant breeding research, Berlin, v. 101, n. 1-2, p. 1-6, July 2000.

AUSUBEL, F. **Current protocols in molecular biology**. New York: J. Wiley, 1998. 530 p.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, Washington, v. 276, n. 5313, p. 726-733, May 1997.

BARGHINI, A. **O milho na América do sul pré-colombiana: uma história natural**. São Leopoldo: Unisinos, 2004. 170 p.

BASU, U.; GOOD, A. G.; TAYLOR, G. J. Transgenic Brassica napus plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1269-1278, Dec. 2001.

BEVAN, M. Binary *Agrobacterium tumefaciens* Vectors for plant transformation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 12, n. 22, p. 8711-8721, Nov. 1984.

BRANDÃO, R. L. **Transformação genética de *Sorghum bicolor* (L. Moench) visando tolerância ao Al<sup>+3</sup>**. 2007. 116 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. 309 p.

BRETTSCHNEIDER, R.; BECKER, D.; LÖRZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature maize embryos. **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 94, n. 3, p. 737-748, Aug. 1997.

BRODMANN, P. D.; ILG, E. C.; BERTHOUD, H.; HERRMANN, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, n. 3, p. 646-653, May/June 2002.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376 p.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, May/June 2005.

CANÇADO, G. M. A.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Genética e bioquímica da tolerância de plantas ao alumínio. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. **Interrelação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 1999. 818 p.

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.

COLLINS, N. C.; SHIRLEY, N. J.; SAEED, M.; PALLOTTA, M.; GUSTAFSON, J. P. An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereal* L.). **Genetics**, Austin, v. 179, n. 1, p. 669-682, May 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2009/2010: terceiro levantamento**. Brasília, 2009. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2graos\\_09.10.pdf](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2graos_09.10.pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2009.

CHRISTENSEN, A. H.; QUAIL, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. **Transgenic Research**, London, v. 5, n. 3, p. 213-218, May 1996.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 675-89, Feb. 1992.



CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; CHEN, H.; YIN, K. C.; CHU, Y. C.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, n. 5, p. 659-668, May 1975.

CRESTANI, M. **Genótipos de aveia branca (*Avena sativa* L.) submetidos a diferentes protocolos e doses de alumínio em cultivo hidropônico**. 2008. 110 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DAÍ, S.; ZHENG, P.; MARMEY, P.; ZHANG, S.; TIAN, W. Z.; CHEN, S. Y.; BEACHY, R. N.; FAU, C. Comparative analysis of transgenic Rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 7, n. 1, p. 25-33, Feb. 2001.

DAVERY, M. R.; COCKING, E. C.; FREEMAN, J.; PEARCE, N.; TUDOR, I. Transformation of Petunia protoplasts by isolated agrobacterium plasmids. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 307-313, June 1980.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET, R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). Part I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, n. 3, p. 685-693, Nov. 1993a.

DELHAIZE, E.; 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of India**, Allahabad, v. 101, n. 42, p. 15249-15254, Oct. 2004.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2255-2262, May 2007.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): part II, Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, n. 3, p. 695-702, Mar. 1993b.

DELHAIZE, E.; TAYLOR, P.; HOCKING, P. J.; SIMPSON, R. J.; RYAN, P. R.; RICHARDSON, A. E. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 391-400, June 2009.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 38, p. 37-59, Dec. 2004.

DONCHEVA, S.; AMENO, S. M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELO, J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 414, p. 1213-1220, Apr. 2005.

DUNDER, E.; DAWSON, J.; SUTTIE, J.; PAGE, G. Maize transformation by microprojectile bombardment of immature embryos. In: POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. (Ed.). **Gene transfer to plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p. 127-138.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Importância econômica**. Sete Lagoas, 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>>. Acesso em: 29 jan. 2009.

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**, Minneapolis, v. 122, n. 3, p. 657-666, Mar. 2000.

EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; KAWAMURA, M.; MATSUMOTO, H. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, n. 3, p. 918-927, Nov. 2001.

FAGARD, B.; VAUCHERET, H. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 167-194, June 2000.

FINER, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 27, n. 4, p. 175-182, Oct. 1991.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, R. P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J. B. **Toxidez de alumínio em culturas anuais**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 35 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: agricultural data. Rome, 2006. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?vesion =ext&hasbulk=0&subset=agriculture.html>>. Acesso em: 2 maio 2006.

FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth. In: CARSON, E. W. (Ed.). **The plant root and its environment**. Charlottesville: University of Virginia, 1974. p. 601-642.

FOY, C. D. General principles involved in screening plants for aluminum and maganese tolerance. In: WRIGHT, M. (Ed.). **Plant adaptation to mineral stress in problem soils**. New York: Cornell University, 1976. p. 65-72.

FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. (Ed.). **Soil acidity and liming**. Madison: ASA, 1984. p. 57-97.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 29, p. 511-566, June 1978.

FRALEY, R. T.; ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; SANDERS, P. R.; FLICK, J. S.; ADAMS, S. P.; BITTNER, M. L.; BRAND, L. A.; FINK, C. L.; FRY, J. S.; GALLUPPI, G. R.; GOLDBERG, S. B.; HOFFMANN, N. L.; WOO, S. C. Expression of bacterial genes in plant cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of Índia**, Allahabad, v. 80, n. 15, p. 4803-4807, Aug. 1983.

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K. W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. I. Improved *agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 10, p. 1024-1034, Oct. 2006.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B. NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 129, n. 1, p. 13-22, May 2002.

FRAME, B. R.; ZHANG, H.; COCCIOLONE, S. M.; SIDORENKO, L. V.; DIETRICH, C. R.; PEGG, S. E.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P. S.; WANG, K. Production of transgenic maize from bombarded Type II calus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 36, n. 1, p. 21-29, Jan. 2000.

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T. M. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. **Bio/Technology**, New York, v. 8, n. 9, p. 839-883, Sept. 1990.

FURLANI, P. R. Efeitos fisiológicos do alumínio em plantas. In: SIMPÓSIO AVANÇADO DE SOLOS E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 2., 1989, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1989. p. 73-87.

FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, J. F. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 48, n. 8, 1081-1091, Aug. 2007.

GALINAT, W. C. The origin of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 1-31.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 1, p. 16-37, Mar. 2003.

GILL, G. W.; FROST, J. K.; MILLER, K. A. A new formula for half-oxidized hematoxylin solution that neither overstain nor requires differentiation. **Acta Cytologica**, Chicago, v. 18, n. 1, p. 300-311, Feb. 1974.

GORDON-KAMM, W. J.; DILKES, B. P.; LOWE, K.; HOERSTER, G.; SUN, X.; ROSS, M.; CHURCH, L.; BUNDE, C.; FARRELL, J.; HILL, P.; MADDOCK, S.; SNYDER, J.; SYKES, L.; LI, Z.; WOO, Y. M.; BIDNEY, D.; LARKINS, B. A. Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of India**, Allahabad, v. 99, n. 18, p. 11975-11980, Sept. 2002.

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

GREEN, C. T.; PHILLIPS, R. L. Plant regeneration from tissue cultures of maize. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 2, 417-421, Apr. 1975.

HANSEN, G.; CHILTON, M. D. "Agroclistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of India**, Allahabad, v. 93, n. 25, p. 14978-14983, Dec. 1996.

HARTWING, I.; OLIVEIRA, A. C. de; CARVALHO, F. I. F. de; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. dos. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, abr./jun. 2007.

HIEI, Y.; OHTA, S.; KOMARI, T.; KUMASHO, T. Efficient transformation of Rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. **The Plant Journal: for cell and molecular biology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 271-282, Aug. 1994.

HOEKENGA, O. A.; HOEKENGA, O. A.; MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; CANÇADO, G. M. A.; SHAFF, J.; KOBAYASHI, Y.; RYAN, P. R.; DONG, B.; DELHAIZE, E.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y.; KOYAMA, H.; KOCHIAN, L. V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of India**, Allahabad, v. 103, n. 25, p. 9738-9743, June 2006.

HOLST-JENSEN, A. **GMO detection methods and validation**. Shanghai, 2003. Disponível em: <<http://www.entransfood.com>>. Acesso: 1 fev. 2010.

HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERBERGEN, A. G. The virulence system of *agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 157-179, Sept. 1994.

HORIKOSHI, T.; DANENBERG, K. D.; STADLBAUER, T. H. W.; VOLKENANDT, M.; SHEA, L. C. C.; AIGNER, K.; GUSTAVSSON, B.; LEICHMAN, L.; FRÖSING, R.; RAY, M.; GIBSON, N. W.; SPEARS, C. P.; DANENBERG, V. Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, n. 1, p. 108-116, Jan. 1992.

HORST, W. J. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Weinheim, v. 158, n. 5, p. 419-428, Sept./Oct. 1995.

HUANG, S.; WEI, Z. Successful *agrobacterium*-mediated genetic transformation of maize elite inbred lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 187-200, Nov. 2005.

IFT EXPERT REPORT ON BIOTECHNOLOGY AND FOODS. Human food safety evaluation of rDNA biotechnology-derived foods: expert report on biotechnology and foods. **Food Technology**, Chicago, v. 54, n. 9, p. 53-61, Sept. 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Lavouras**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200904comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200904comentarios.pdf)>. Acesso: 29 jan. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Milho (em grão) 1ª e 2ª safras - Brasil, grandes regiões, unidades da federação e municípios**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2006/Milho\\_1\\_2\\_safra\\_2002\\_2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2006/Milho_1_2_safra_2002_2006.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2009.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, New York, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, June 2007.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea Mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 6, p. 745-750, June 1996.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 20, n. 1, p. 57-66, Jan. 2003.

KLEIN, T. M.; KORNSTEIN, L.; SANFORD, J. C.; FROMM, M. E. Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 91, n. 1, p. 440-444, Sept. 1989.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, n. 6117, p. 70-73, May 1987.

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

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils: mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, June 2004.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDIX, D.; MCPHERSON, K.; MEGHJI, M. R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, G. W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *B. thuringiensis*. **Bio/Technology**, New York, v. 11, n. 2, p. 194-200, Feb. 1993.

- LEE, L. Y.; GELVIN, S. B. T-DNA binary vectors and systems. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, n. 2, p. 323-332, Feb. 2008.
- LEITE, A.; KEMPER, E. L.; SILVA, M. J. da; LUCHESSI, A. D.; SILOTO, R. M. P.; BONACORSSI, E. D.; EL-DORRY, H. F.; ARRUDA, P. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 6, n. 1, p. 47-53, Feb. 2000.
- MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 273-278, June 2001.
- MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the poaceae. **Genetics**, Austin, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, Aug. 2004.
- MAGALHÃES, J. V.; GUIMARÃES, C. T. **Tolerância ao alumínio em sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008.
- MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G.; ALVES, V. M.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, Sept. 2007.
- MAGNAVACA, R. **Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize**. 1982. 135 p. Tese (Philosophical Doctor) - University of Nebraska, Lincoln.
- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminium tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.
- MARION, G. M.; HENDRICKS, D. M.; DULL, G. R.; FULLER, W. H. Aluminium and silica solubility in soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 76-85, Jan. 1976.
- MARTINES, C. P. **Aluminum toxicity studies in rice**. 1977. 113 p. Tese (PHD in Agronomie) - Oregon State University, Corvallis.



MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, New York, v. 200, p. 1-40, Sept. 2000.

MATTHYSSE, A. G.; YARNALL, H.; BOLES, S. B.; MCMAHAN, S. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1490, n. 1-2, p. 208-212, Jan. 2000.

MCCABE, D. E.; MARTINELLI, B. J. Transformation of elite cotton cultivars by particle bombardment of meristems. **Bio/Technology**, New York, v. 11, n. 5, p. 596-598, May 1993.

MIR, L. **Genômica**. São Paulo: Athenue, 2004.

MIRAGLIA, M.; BERDAL, K. G.; BRERA, C.; CORBISIER, C.; HOLST-JENSEN, A.; KOK, A. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 1157-1180, July 2004.

MURPHY, L. D.; HERZOG, C. E.; RUDICK, J. B., FOJO, A. T.; BATES, S. E. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 45, p. 10351-10356, Nov. 1990.

NEGROTTO, D.; JOLLEY, M.; BEER, S.; WENCH, A. R.; HANSEN, G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 8, p. 798-803, July 2000.

OFFRINGA, R.; ELZEN, P. J. M. van den; HOOYKAAS, P. J. J. Gene targeting in plants using the *Agrobacterium tumefaciens* vector system. **Transgenic Research**, London, v. 1, n. 3, p. 114-123, May/June 1992.

OLMOS, J. I. L.; CAMARGO, M. N. Ocorrência de alumínio tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 171-180, fev. 1976.

PANDEY, S.; CEBALHOS, H.; GRANADOS, G.; KNAPP, E. Developing maize that tolerates aluminium toxic soils. In: EDMEADES, G. E.; DEUSTCH, J. A. (Ed.). **Stress tolerance breeding: maize that resist insects, drought, low nitrogen and acid soils**. México: Centro Internacionl de Mejoramento de Maiz y Trigo, 1994. p. 85-96.

PAREDDY, D.; PETOLINO, J.; SKOKUT, T.; HOPKINS, N.; MILLER, M.; WELTER, M. Maize transformation via helium blasting. **Maydica**, Bergamo, v. 42, n. 1, p. 143-154, Aug. 1997.

PARKER, D. R.; NORVELL, W. A.; CHANEY, R. L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R. H.; SCHWAB, A.P.; GOLDBERG, S. (Ed.). **Chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p. 253-269.

PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. **Melhoramento e produção do milho**. 2. ed. rev. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 536 p.

PAZ, M. M.; SHOU, H.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; BANERJEE, A. K.; WANG, K. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. **Euphytica**, Wageningen, v. 136, n. 2, p. 167-179, 2004.

PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, D.; CARNEIRO, A. A.. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 371-378, fev. 2008.

PHILLIPS, R. L.; SOMERS, D. A.; HIBBERD, K. A. Cell/Tissue Culture and *in vitro* manipulation. In: CORN AND CORN IMPROVEMENT. **Agronomy monograph**. 3. ed. Madison, 1988. cap. 5, p. 345-387.

PLANT BIOTECHNOLOGY OFFICE. **The Biology of *Zea mays* L. (Corn/Maize)**. Ottawa, 1994. 11p. (Biology Document BIO1994-11).

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-93, June 1999.

RECH, E. L.; MULLIGAN, B. J.; DAVERY, M. R. Gene transfer via protoplast. In: CHARLWOOD, B. V.; DIXON, R.; MOLINA, J. (Ed.). **Plant cell culture and its application**. London: Arnold, 1991.

RENGEL, Z. Uptake of aluminum by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, n. 3, p. 389-406, Nov. 1996.

RIBAS, A. F.; KOBAYASHI, A. K.; GALVÃO, R. M.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Transformação de *Coffea canephora* P. com gene para resistência ao glufosinato de amônio usando bombardeamento de partículas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA SOBRE OS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: Embrapa, 2001. p. 34.

RIBAS, A. F.; PEREIRA, F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 83-94, jan./abr. 2006.

ROCHE Portugal. **Introdução à PCR**. Lisboa, 2010. Disponível em: <<http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr>>. Acesso em: 9 jan. 2010.

ROMANO, E. Análise da Integração do DNA pela técnica de Southern Blot. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 221-227.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, June 2001.

RYAN, P. R., DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 437-446, Feb. 1993.

RYAN, P. R.; LIU, Q.; SPERLING, P.; DONG, B.; FRANKE, S.; DELHAIZE, E. A higher plant delta-8 sphingolipid desaturase with a preference for (Z)-isomer formation confers aluminum tolerance to yeast and plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 144, n. 4, p. 1968-1977, Aug. 2007.

SAGHAI-MARROF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of Índia**, Allahabad v. 89, n. 2, p. 1477-1481, June 1984.

SANCHEZ, P.; SHEPARD, K.; SOULE, M.; PLACE, F.; BURESH, R. Soil fertility replenishment in Africa: an investment in natural resource capital. In: BURESH, R.; SANCHEZ, P.; CALHOUN, F. (Ed.). **Replenishing soil fertility in Africa**. Madison: Soil Science, 1997. p. 1-46.

SANFORD, J. C. The biolistic process: a new concept in gene transfer and biological delivery. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6, n. 12, p. 299-302, Dec. 1988.

SANTARÉM, E. R. Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. **Revista Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 15, p. 81-90, jun. 2000.

SANTARÉM, E. R.; FERREIRA, A. G. Transformação de soja via bombardeamento de partículas. **ABCTP Notícias**, Brasília, v. 9, p. 2-9, 1997.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSYHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 37, n. 5, p. 645-653, Mar. 2004.

SCHAFER, W.; GORZ, A.; GUNTER, K. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 327, n. 6139, p. 529-532, Oct. 1987.

SHOU, H.; FRAME, B. R.; WHITHAM, S. A.; WANG, K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 201-208, Feb. 2004.

SILVA, A. A. **Toxicidade de alumínio em trinta genótipos de Panicum maximum Jacq. cultivados em solução nutritiva**. Piracicaba: ESALQ, 1997. 149 p.

SILVA, J. B. C. **Seleção de genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tolerantes à toxidez de alumínio**. 1983. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SMITH, B. **The emergence of agriculture**. New York: Scientific American Library, 1995.

SONGSTAD, D. D.; ARMSTRONG, C. L.; PETERSEN, W. L.; HAIRSTON, B.; HINCHEE, M. A. W. Production of transgenic maize plants and progeny by bombardment of Hi II immature embryos. **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 32, n. 3, p. 179-183, July 1996.

SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 1975.

SOUTHGATE, E. M.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; WESTCOTT, R. J. A comparison of methods for direct Gene transfer into maize (*Zea mays* L.). **In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Mariland, v. 34, n. 3, p. 218-224, July 1998.

STACHEL, S. E.; MESSENS, E.; MONTAGU, M. van; AMBRYSKI, P. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells which activate the T-DNA transfer process in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature**, London, v. 318, n. 6047, p. 624-629, Dec. 1985.

TESFAYE, M.; TEMPLE, S. J.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, n. 4, p. 1836-1844, Dec. 2001.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1999. 864 p.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants; biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 147-154, Apr. 2006.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plants cells by *Agrobacterium*. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 12, n. 3, p. 121-129, Apr. 2002.

UESKÜLL, H. R. von; MUTER, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, n. 1, 1-15, June 1995.

VASIL, I. K. Developing cell and tissue culture systems of the improvement of cereal and grass crops. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 128, n. 1, p. 193-218, Jan. 1987.

VASIL, V.; LU, C. Y.; VASIL, I. K. Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize. **Protoplasma**, New York, v. 127, n. 1/2, p. 1-8, Feb. 1985.

VASIL, V.; VASIL, I. K. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* X *P. purpureum* hybrid. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 68, n. 6, p. 864-872, 1981.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; MOURRAIN, P.; PALAUQUI, J. C.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 651-659, June 1998.

WANG, J. P.; RAMAN, H.; ZHOU, M. X.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; COOMBES, N.; MENDHAM, N. High-resolution mapping of the Alp locus and identification of a candidate gene HvMATE controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**: international journal of plant breeding research, Berlin, v. 115, n. 2, p. 265-276, July 2007.

WANG, K.; FRAME, B. Maize transformation. In: CURTIS, I. S. (Ed.). **Transgenic crops of word**: essential protocols. Amsterdam: Kluwer, 2004. p. 45-62.

WANG, W.; PAN, J.; ZHENG, K.; CHEN, H.; SHAO, H.; GUO, Y.; BIAN, H.; HAN, N.; WANG, J.; ZHU, M. Ced-9 inhibits Al-induced programmed cell death and promotes Al tolerance in tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 383, n. 1, p. 141-145, May 2009.

WEIGHARDT, F. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 Zea mays event. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 87, n. 6, p. 1342-1355, Sept./Oct. 2004

WINANS, S. C. Two-way chemical signalling in *Agrobacterium*-plant interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 56, n. 1, p. 12-31, Mar. 1992.

ZAMBRYSKI, P.; JOOS, H.; GENTELLO, C.; LEEMANS, J.; MONTAGU, M. van; SCHELL, J. S. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, Oxford, v. 2, n. 12, p. 2143-2150, 1983.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, n. 3/4, p. 215-230, Nov. 2001.

ZEIGLER, R. S.; PANDEY, S.; MILES, J.; GOURLEY, L. M.; SARKARUNE, S. Advances the selection and breeding of acid tolerant plants: rice, maize, sorghum and tropical forages. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMENT, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-Soil interactions at low pH: principles and management**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 391-406.

ZHAO, Z. Y.; GU, W.; CAI, T.; TAGLIANI, L. A.; HONDRED, D. A.; BOND, D.; KRELL, S.; RUDERT, M. L.; BRUCE, W. B., PIERRE, D. A. Molecular analysis of T<sub>0</sub> plants transformed by *Agrobacterium* and comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation with bombardment transformation in maize. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Missouri, v. 72, p. 34-37, June 1998.

ZHAO, Z. Y.; GU, W., CAI, T.; TAGLIANI, L. A.; HONDRED, D. A.; BOND, D.; SHROEDER, S.; RUDERT, M.; PIERCE, D. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 4, p. 323-333, Aug. 2001.

ZIEMIENOWICZ, A. Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 48, n. 3, p. 623-635, June 2001.

## ANEXOS

	<b>Página</b>
ANEXO A Sequenciamento.....	92
ANEXO B Transformação bacteriana via choque térmico (Brasileiro et al., 1998 ).....	93
ANEXO C Meio YEP.....	97
ANEXO D Meio de infecção.....	97
ANEXO E Meio de co-cultivo (CC).....	98
ANEXO F Meio de repouso.....	99
ANEXO G Meio de seleção (SE AGRO).....	100
ANEXO H Acetoseríngona.....	101
ANEXO I Análise de variância dos genótipos não transgênicos em atividades 27, 39 e 60 $\mu\text{M}$ de Al, comparando o crescimento radicular em solução hidropônica.....	101
ANEXO J Análise de variância dos eventos transgênicos e não transgênicos usados para o teste de tolerância em solução hidropônica com {60} $\mu\text{M}$ de Al.....	102
ANEXO K Composição dos meios de cultivo usados para a cultura de tecidos de milho.....	103
ANEXO L Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho (Magnavaca, 1982).....	106



## ANEXO A Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi preparada utilizando-se 200ng de DNA plasmidial; 2 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 µL do tampão 5x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 1 µL de primer a 5 µM, em um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas em termociclador PCR System 9700 GeneAmp® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 96°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Foram usados os primers F (CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG), UbiFa2, U5 (TCA CGG CAC GGC AGC TAC), MJ13 (CCG CCG GCG TGA AAA AGA CTA) e R.

Após o término dos ciclos da reação, adicionou-se 40 µL de isopropanol 75% (v/v), homogeneizou e deixou no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4.000 rpm por 45 minutos. Em seguida, retirou-se o isopropanol vertendo-o diretamente na pia. A placa foi seca gentilmente em papel toalha tomando o cuidado de não descartar o pellet. Adicionou-se 100 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugou-se com a mesma velocidade citada anteriormente por 10 minutos. Retirou-se o etanol vertendo-o diretamente na pia, foi dado um leve spin na placa voltada para baixo tomando o cuidado de não perder o pellet. Adicionou-se 10 µL de formamida HI-DI e desnaturou-se em termociclador PCR System 9700 GeneAmp® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a 95°C por 5 minutos. Transferiu-se para o gelo e injetou-se no aparelho ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

ANEXO B Transformação bacteriana via choque térmico (Brasileiro et al., 1998 ).

*E. coli* - 50 µL de células competentes da bactéria hospedeira *E. coli* Top'F1 (Kit pYES2 – Invitrogen) e 1 µL da ligação da construção gênica *Ubiq::SbMATE::NOS* no plasmídeo pCAMBIA 3301 foram homogeneizado gentilmente em um microtubo. Posteriormente, o microtubo foi incubado em gelo durante 30 minutos e transferido para banho-maria a 42°C durante 1 minuto. Em seguida, o microtubo foi rapidamente transferido para o banho de gelo por 2 minutos. Após esse período, foram adicionados 400 µL de meio LB *Luria-Bertani* (10 g/L de Triptona, 5 g/L de Extrato de Levedura, 10 g/L de NaCl) e a mistura incubada em banho-maria a 37°C durante 45 minutos. 100 µL da solução foi plaqueada em meio LB sólido contendo 100 mg/L de ampicilina e 50 µL da solução X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) e incubada a 37°C/16 horas.

Dez colônias brancas formadas na placa contendo o meio LB (indicativo de uma clonagem correta) foram inoculadas separadamente em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 mg/L de ampicilina, overnight em shaker a 37°C. Em seguida, o plasmídeo foi extraído, digerido com *HindIII* para confirmação do inserto. Estoque a -80°C da bactéria contendo a construção correta foram feitos. Esses estoques foram utilizados para a produção da construção gênica, em larga escala, para o bombardeamento de partículas.

*A. tumefaciens* – Incubou-se a bactéria em 3 mL de meio YEP a 28°C com antibiótico apropriado, sob agitação constante de 100 a 150 rpm durante 12 a 16 horas. Em seguida, 2 mL da cultura foi transferido para 50 mL de meio YEP em um erlenmeyer de 250 mL, e incubado à 28°C nas mesmas condições anteriores, até as células atingirem a fase exponencial de crescimento ( $A_{600}$  de 0,5 a 1,0). Posteriormente a cultura foi incubada em gelo por aproximadamente

15 minutos. Após esse período, centrifugou-se as células a 5.000g por 5 min. a 4°C, e descartou-se o sobrenadante ressuspendido delicadamente as células em 1 mL de CaCl<sub>2</sub>20mM contendo glicerol 10% (v/v) mantido a 4°C. Estoques de 100 µL de células competentes foram congeladas em nitrogênio e mantidas a -80°C.

Adicionou-se aproximadamente 1 µL de DNA plasmidial por alíquota de células competentes e misturou-se delicadamente, em seguida incubou-se em gelo por 30 minutos. Após esse período, as células (foram?) incubadas em nitrogênio líquido até a solidificação, ou em gelo seco/etanol. Imediatamente as células foram transferidas por 5 min em banho de 37°C. Em seguida adicionou-se 1 mL de meio YEP homogeneizou-se delicadamente com a pipeta e incubou-se por 2 horas à 28°C. Posteriormente, plaqueou 100 µL da suspensão de células em meio YEP contendo os antibióticos apropriados e em seguida incubou à 28°C até o crescimento e aparecimento de colônias isoladas (dois a três dias). Coletaram-se algumas colônias transformadas e conferiu-se a integridade do vetor transferido.

### **Extração do DNA plasmidial mini prep**

A extração de DNA maxi prep plasmidial, foi feita segundo Ausubel, 1998.

Centrifugou-se (14.000 rpm), 1,5 mL da solução bacteriana por 30 segundos, em seguida descartou-se todo o sobrenadante e ressuspendeu o precipitado em 200µL de solução I. Adicionou-se 200µL de solução II e deixou por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200µL de solução III e deixou 10 minutos no gelo. Posteriormente centrifugou-se (14.000 rpm) por 5 minutos e transferiu o sobrenadante para um novo microtubo, adicionando 800µL de etanol 95% gelado e deixando por 15 minutos à -80°C. Em seguida centrifugou-se (14.000 rpm) por 10 minutos e descartou o sobrenadante. Novamente centrifugou-se (14.000 rpm) por 20 segundos para que

todo o sobrenadante fosse descartado. Adicionou-se 180  $\mu$ L de etanol 70% sobre o pellet e centrifugou-se por 20 segundos, em seguida descartou-se todo o sobrenadante.

O pellet foi seco em estufa 65°C por 10 minutos e ressuspensionado em 30  $\mu$ L de água ultra pura autoclavada. Adicionou-se 1  $\mu$ L de RNase (1:10) e posteriormente armazenou-se em geladeira até o uso.

TABELA Soluções para extração de DNA plasmidial

Solução I	Solução II	Solução III
Glicose 50 mM	NaOH 0,2 M	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> 3M Acetato de Potássio C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> 5M Ácido Acético
Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM	SDS 1%	
EDTA (pH 8,0) 10 mM	<i>Preparo na hora do uso</i>	

### Extração de DNA maxi prep plasmidial

A extração de DNA maxi prep plasmidial, foi feita segundo Ausubel, 1998.

Centrifugou-se (3.000 rpm) 80 mL de solução bacteriana por 10 minutos, em seguida descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado (vortex) com 1000  $\mu$ L de solução I. Posteriormente adicionou-se 2000  $\mu$ L de solução II, homogeneizou e deixou a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida adicionou 1500  $\mu$ L de solução III, homogeneizou e deixou no gelo por 10 minutos. Centrifugou-se por 10 minutos (10.000 rpm), e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, adicionou-se 3 mL de fenol:clorofórmio (1:1), homogeneizou-se durante 2 minutos em vortex. Posteriormente centrifugou-se (10.000 rpm) por 10 minutos e retirou-se a fase superior, transferindo-o para um novo tubo. Adicionou-se 3 mL de clorofórmio, homogeneizando por 2 minutos em vortex. Em seguida centrifugou-se por 10 minutos (10.000 rpm) e retirou-se

a fase superior, transferindo-o para um novo tubo. Adicionou-se 6 mL de etanol 95%, homogeneizou e armazenou-se por 30 minutos à -80°C. Posteriormente centrifugou-se (10.000 rpm) por 10 minutos, e descartou-se todo o sobrenadante e adicionou-se ao pellet, 10 mL de etanol 70% (gelado). Homogeneizou em vortex. Centrifugou-se (10.000 rpm) por 5 minutos e descartou todo o sobrenadante.

O pellet foi seco em estufa 65°C por 10 minutos e ressuspendido em 300 µL de água.

O plasmídeo foi armazenado em freezer -80°C.

ANEXO C Meio YEP

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
Extrato de levedura	5 mg.L <sup>-1</sup>
Peptona	10 mg.L <sup>-1</sup>
NaCL	5 mg.L <sup>-1</sup>
pH	6.8
Bacto-Àgar	15 mg.L <sup>-1</sup>
Esterilização	Autoclavar por 121/C/30minutos

**PREPARO:** Dissolver os reagentes acima em aproximadamente 800 mL de água deionizada, aferir o pH com NaOH ou HCl e completar o volume para 1 litro. Colocar 500 mL de meio em cada erlermayer de 1.000 mL com a quantidade necessária de gelificante.

ANEXO D Meio de infecção

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
N6 Sais (Chu et al., 1975)	3,98 g.L <sup>-1</sup>
N6 vitaminas (1000X)	1 mL. L <sup>-1</sup>
2,4D	1,5 mg.L <sup>-1</sup>
L-Prolina	0,7 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose P.A	68,4 g.L <sup>-1</sup>
Glicose	36 g.L <sup>-1</sup>
pH	5.2
Esterilização	Filtrar a vácuo e armazenar a 4/C

**PREPARO:** Dissolver os reagentes acima em aproximadamente 800 mL de água, aferir o pH com auxílio de KOH ou HCl e filtrar em bomba de vácuo.

ANEXO E Meio de co-cultivo (CC).

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
N6 Sais	3,98 g.L <sup>-1</sup>
N6 Vitaminas (1000X)	1 mL.L <sup>-1</sup>
2,4D	1,5 mg.L <sup>-1</sup>
L- Prolina	0,7 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g.L <sup>-1</sup>
pH	5.8
Phitagel®	2,25 g.L <sup>-1</sup>
Esterilização	Autoclavar a 121°C por 30 minutos.
AgNO <sub>3</sub>	0,85 mg.L <sup>-1</sup>
Acetoseríngona	100µM
<sup>1</sup> Cisteína	300 mg.L <sup>-1</sup>

**PREPARO:** Dissolver os reagentes acima (com exceção do gelificante) em aproximadamente 800 mL de água deionizada, aferir o pH com auxílio de KOH ou HCl e completar o volume para 1 litro. Colocar 500 mL de meio em cada erlenmeyer de 1.000 mL com a quantidade necessária de gelificante. Depois de autoclavado, adicionar os reagentes pós-esterilização e em fluxo laminar.

**<sup>1</sup>Cisteína**

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
Cisteína	300 mg.L <sup>-1</sup>
Água estéril	4 mL

**PREPARO:** Dissolver a cisteína em 1 mL de água estéril. Aliquotar em tubos Eppendorfs® e utilizar a fresco.

ANEXO F Meio de repouso

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
N6 Sais	3,98 g.L <sup>-1</sup>
N6 Vitaminas (1000X)	1 mL.L <sup>-1</sup>
2,4D	1,5 mg.L <sup>-1</sup>
L- Prolina	0,7 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g.L <sup>-1</sup>
Mês	0,5 g.L <sup>-1</sup>
pH	5.8
Ágar®	2,25 g.L <sup>-1</sup>
Esterilização	Autoclavar a 121°C por 30 minutos.
AgNO <sub>3</sub>	0,85 mg.L <sup>-1</sup>
Cefotaxima	100 mg.L <sup>-1</sup>
Vancomicina	100 mg.L <sup>-1</sup>

**PREPARO:** Dissolver os reagentes acima (com exceção do gelificante) em aproximadamente 800 mL de água deionizada, aferir o pH com auxílio de KOH ou HCl e completar o volume para 1 litro. Colocar 500 mL de meio em cada erlenmeyer de 1.000 mL com a quantidade necessária de gelificante. Depois de autoclavado, adicionar os reagentes pós esterilização em fluxo laminar.



ANEXO G Meio de seleção (SE AGRO)

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
N6 Sais	3,98 g.L <sup>-1</sup>
N6 Vitaminas (1000X)	1 mL.L <sup>-1</sup>
2,4D	1,5 mg.L <sup>-1</sup>
L- Prolina	0,7 g.L <sup>-1</sup>
Sacarose	30 g.L <sup>-1</sup>
Mês	0,5 g.L <sup>-1</sup>
pH	5.8
Àgar®	8 g.L <sup>-1</sup>
Esterilização	Autoclavar a121/C por 30 minutos.
AgNO <sub>3</sub>	0,85 mg.L <sup>-1</sup>
Cefotaxima	100 mg.L <sup>-1</sup>
Vancomicina	100 mg.L <sup>-1</sup>
PPT	3 mg.L <sup>-1</sup> , 6 mg.L <sup>-1</sup> e 9 mg.L <sup>-1</sup>

**PREPARO:** Dissolver os reagentes acima (com exceção do gelificante) em aproximadamente 800 mL de água deionizada, aferir o pH com auxílio de KOH ou HCl e completar o volume para 1 litro. Colocar 500 mL de meio em cada erlenmeyer de 1.000 mL com a quantidade necessária de gelificante. Depois de autoclavado, adicionar os reagentes pós esterilização em fluxo laminar.

ANEXO H Acetoseríngona

<i>Componentes</i>	<i>Quantidades</i>
Acetoseríngona P.A	39,24 mg/mL
DMSO	1 mL
Água estéril	1 mL

**PREPARO:** Dissolver a AS em 1 mL de DMSO. Adicionar 1 mL de água estéril. Aliquotar em tubos Eppendorfs® e armazenar em freezer -20/C.

ANEXO I Análise de variância dos genótipos não transgênicos em atividades 27, 39 e 60  $\mu$ M de Al, comparando o crescimento radicular em solução hidropônica.

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Pr&gt;Fc</b>
Genótipo	3	22342.811698	7447.603899	8.296	0.0000
Atividade	2	33294.330111	16647.165055	18.544	0.0000
Erro	138	123882.732291	897.700959		
Total corrigido	143	179519.874100			
CV (%)	41.53				
Média geral	72.1401584	Número de observações: 144			

Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO J Análise de variância dos eventos transgênicos e não transgênicos usados para o teste de tolerância em solução hidropônica com {60}  $\mu\text{M}$  de Al.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Genótipo	52	97868.54088 3	1882.08732 5	6.936	0.0000
Indivíduo	40	16256.67574 0	406.416894	1.498	0.0268
<sup>1</sup> Tipo	1	17154.75351 5	17154.7535 15	63.219	0.0000
<sup>2</sup> Método	2	34118.31822 0	17059.1591 10	62.866	0.0000
Erro	676	183436.3717 99	271.355580		
Total corrido	771	348834.6601 56			
CV (%)	34.91				
Média geral	47.1800448	Número de observações: 772			

Teste de Tukey a 5% de probabilidade. <sup>1</sup> Transgênico ou não transgênico. <sup>2</sup> *Agrobacterium tumefaciens*, biobalística ou sem transformação

ANEXO K Composição dos meios de cultivo usados para a cultura de tecidos de milho

REAGENTES	MEIO IC (Iniciação de calos) 1L	MEIO OSM (Osmótico) 1L	MEIO SE (Seleção) 1L	MEIO RM (Maturação) 1L	MEIO GE (Germinação) 1L
<sup>1</sup> N6 sais	3,98 g	3,98 g	3,98 g	0	0
<sup>2</sup> N6 vitaminas (100x)	10 mL	10 mL	10 mL (sem glicina)	0	0
<sup>3</sup> MS sais	0	0	0	4,3 g	4,3 g
<sup>4</sup> MS vitaminas (1000x)	0	0	0	1 mL	1 mL
<sup>5</sup> 2,4-D (estoque 1 mg/mL)	2 mL	2 mL	2 mL	0	0
<sup>6</sup> Myo-Inositol	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg
<sup>7</sup> Prolina	2,76 g	0,69 g	0	0	0
<sup>8</sup> Caseína Hidrolisada	100 mg	100 mg	0	0	0
<sup>9</sup> Sacarose	30 g	30 g *	30 g	60 g	30 g
Sorbitol	0	36,4 g	0	0	0
Manitol	0	36,4 g	0	0	0
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
<sup>10</sup> Phytigel	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
<b>Esterilização</b>	Autoclavar 121°C/ 35min/1atm	Autoclavar 121°C/ 35min/1atm	Autoclavar 121°C/ 30min/1atm	Autoclavar 121°C/ 35min/1atm	Autoclavar 121°C/ 35min/1atm
<sup>11</sup> AgNO <sub>3</sub> (estoque 100 mM)	250 µL	250 µL	50 µL	0	0
<sup>12</sup> PPT	0	0	6 ou 9 mg	6 mg	3 mg

<sup>1</sup> Mistura basal de sais com macro e micronutrientes (Sigma C-1416)

<sup>2</sup> N6 vitaminas (1000x)  
Tiamina HCl 100 mg  
Piridoxina HCl 50 mg

Ácido Nicotínico 50 mg

Glicina 200 mg

Complete o volume para 1.000 mL e estoque em frasco escuro a 4°C. Utilizar o balão volumétrico. Essa solução não precisa ser filtrada, pois é adicionada ao meio antes desse ser autoclavado.

<sup>3</sup> Mistura basal de sais com macro e micronutrientes (Sigma M-5524)

<sup>4</sup> Vitaminas MS (adicionar 1 mL em cada litro de meio) – Estoque 1000x

Ácido nicotínico 25 mg

Piridoxina HCl 25 mg

Tiamina 50 mg

Glicina 100 mg

Dissolver em ~30 mL de água mili-Q e completar o volume para 50 mL. Utilizar o balão volumétrico. Essa solução não precisa ser filtrada, pois é adicionada ao meio antes desse ser autoclavado.

<sup>5</sup> 2,4 D (Sigma D-84072) / 2,4-dichlorophenoxyacetic acid / 2,4-D (1 mg/mL): Dissolva 0,125 g de 2,4-D em 4 mL 1N KOH. Aqueça gentilmente, sob agitação, até dissolver completamente. Adicione 121 mL de ddH<sub>2</sub>O. Proteja o frasco da luz (cubra com papel alumínio) e estoque a 4°C.

<sup>6</sup> Myo-Inositol (Sigma I-7508)

<sup>7</sup> Prolina (Sigma P-8449)

<sup>8</sup> Caseína hidrolisado

<sup>9</sup> A sacarose comercial é comprada em supermercados

<sup>10</sup> Phytigel (Sigma P-8169)

<sup>11</sup> Solução AgNO<sub>3</sub> (100mM)

Pese 169,9 mg de AgNO<sub>3</sub> e complete o volume para 10 mL utilizando um balão volumétrico. Esterilize por filtração e estoque em recipiente protegido de luz a 4°C.

<sup>12</sup> PPT – Herbicida comercial FINALE® Agrevo

\* Na ausência de sorbitol e manitol, colocar 60 g de sacarose.

ANEXO L Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho (Magnavaca, 1982)

	Solução estoque				mg elemento/l		Composição		
	Elemento	Fonte	g/l	ml esto/l.	Cátion	Ânion	Elem	mg/l	µM
<b>Solução 1</b>	Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	270	3,08	Ca:141,1	NO <sub>3</sub> -N:98,6	Ca	141,1	3527
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33,8		NH <sub>4</sub> -N:18,2	NO <sub>3</sub> -N:18,2	K	90,1	2310
								Mg	20,8
<b>Solução 2</b>	K	KCL	18,6	2,31	K:22,5	Cl:20,4	NO-N	152	10857
		K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	44		K:45,6	SO <sub>4</sub> -S:18,7	NH <sub>4</sub> -N	18,2	1300
		KNO <sub>3</sub>	24,6		K:22,0	NO <sub>3</sub> -N:7,9	P	1,4	45
							S	18,8	587
<b>Solução 3</b>	Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	142,4	1,54	Mg:20,8	NO <sub>3</sub> -N:24,0	B	0,27	25
<b>Solução 4</b>	P	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,6	0,35	K:1,7	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :1,4	Fe	4,3	77
							Mn	0,04	0,63
<b>Solução 5</b>	Fe	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	20,3	1,54	Fe:4,3	NO <sub>3</sub> -N:3,3	Cu	0,08	0,83
		HEDTA	13,4			HEDTA:0,26	Mo	0,15	2,29
							Zn	0,15	2,29
							Na	0,04	1,74
<b>Solução 6</b>	Micro			0,77			HEDTA	20,06	75
	Mn	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,34		Mn:1,5	Cl:0,65			
	B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,04			BO <sub>3</sub> -H:0,27			
	Zn	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,88		Zn:0,15	SO <sub>4</sub> -S:0,07			
	Cu	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2		Cu:0,04	SO <sub>4</sub> -S:0,02			
	Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,26		Na:0,04	MoO <sup>4</sup> -M:0,08			
<b>Solução 7</b>	Al	AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	43,888	2,4					