



**ANÁLISES DO PROMOTOR DO GENE  
TRANSPORTADOR DE FOSFATO DE  
*Arabidopsis thaliana* - AtPT2 – EM PLANTAS DE  
MILHO TRANSGÊNICAS.**

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO  
COELHO**

**2005**

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO**

**ANÁLISES DO PROMOTOR DO GENE TRANSPORTADOR DE  
FOSFATO DE *Arabidopsis thaliana* - AtPT2 – EM PLANTAS DE MILHO  
TRANSGÊNICAS**

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

Orientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

Lavras  
Minas Gerais – Brasil  
2005

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

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto.

Análises do promotor do gene transportador de fosfato de *Arabidopsis thaliana* -AtPT2 - em plantas de milho transgênicas / Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho. -- Lavras : UFLA, 2005.

83 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Milho. 2. Promotor. 3. Transgênico. 4. Gene repórter. 5. Estresse abiótico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-6

**GRACIELLE TEODORA DA COSTA PINTO COELHO**

**ANÁLISES DO PROMOTOR DO GENE TRANSPORTADOR DE  
FOSFATO DE *Arabidopsis thaliana* - AtPT2 – EM PLANTAS DE MILHO  
TRANSGÊNICAS**

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

Aprovada em 21 de dezembro de 2005

PhD. Andréa Almeida Carneiro

EMBRAPA Milho e Sorgo

PhD. Newton Portilho Carneiro

EMBRAPA Milho e Sorgo



Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva  
UFLA  
(Orientador)

Lavras  
Minas Gerais – Brasil

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus amados pais, Firmino e Carminha e meus irmãos, Richard e Letícia,  
pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.**

**Ao meu amado esposo, por todo o seu carinho.**

**A Deus, pela oportunidade.**

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, Carminha e pai, Firmino; aos irmãos, Leticia e Richard e ao meu amado esposo, Gustavo, pelo incentivo e credibilidade. A Dra. Andréa, Dr. Newton e Dr. Luciano, pela confiança depositada. Ao Dr. Robert Eugene Scharffert pelo apoio e credibilidade. Aos amigos do LBC, Rosangela, Mariana, Raymundo, Patrícia, Ruth e Carol, pelo auxílio e apoio. À pesquisadora Isabel, pela ajuda. A amiga Maiana, pelas dicas. Às amigas que tornaram esta temporada fora de casa algo melhor, Karine, Paula, Girlene e Cíntia. Ao amigo Marcelo Murad pelas dicas. A todos aqueles que acreditaram em mim. À UFLA, pela oportunidade e a todos do setor de Fisiologia Vegetal, pela amizade. A CAPES, Mc knight Foundation e à EMBRAPA, pelo apoio financeiro e contrapartida institucional. Principalmente a Deus, por ter me concedido a graça de poder percorrer mais esta etapa da vida.

A todos, o meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A cultura do milho.....	4
2.2 Fósforo .....	5
2.3 Assimilação e remobilização do fósforo .....	8
2.4 Promotores e regulação gênica.....	12
2.4.1 Genes e promotores induzidos pela deficiência fosfórica em raiz .....	16
2.4.2 Fatores de transcrição.....	21
2.4.3 Genes de microrganismos que ativam promotores raiz-específicos relacionados com a deficiência fosfórica .....	23
2.5 Métodos para introdução de genes em plantas .....	24
2.6 Transferência de genes usando biolística .....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Preparação do explante e cultura de tecidos.....	30
3.2 Construções gênicas .....	31
3.3 Bombardeamento de Partículas .....	32
3.4 Seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas.....	34
3.5 Análises de plantas transgênicas .....	36
3.5.1 - Isolamento do DNA genômico.....	36
3.5.2 PCR: Reação em Cadeia da Polimerase .....	36
3.5.3 Southern Blot.....	38
3.5.4 Análise da expressão do cassete AtPT2.GUS em plantas transgênicas ...	39
3.5.4.1 Análise histoquímica .....	39
3.5.4.2 Análise fluorimétrica.....	41

3.5.4.3 RT-PCR.....	42
3.5.4.3.1 Obtenção do RNA total .....	42
3.5.4.3.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase....	43
3.5.4.3.3 Análises de seqüências do promotor .....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
4.1 Obtenção de explantes por cultura de tecidos .....	45
4.2 Bombardeamento de partículas, seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas.....	47
4.3 Análises de plantas transgênicas .....	50
4.4 Análises de seqüências do promotor .....	54
4.5 Análise da expressão do cassete AtPT2.GUS em plantas transgênicas .....	59
4.5.1 - Análise histoquímica e fluorométrica .....	59
4.5.2 - RT-PCR.....	67
5 CONCLUSÕES.....	69
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70



## RESUMO

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto. **Análises do Promotor do Gene Transportador de Fosfato de *Arabidopsis thaliana* - AtPT2 – em Plantas de Milho Transgênicas.** 2005. 112 p. Dissertação (Mestre em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Fósforo é um dos macronutrientes requerido pelas plantas que se encontra, frequentemente, em baixas concentrações no solo (2 a 10  $\mu\text{m}$ ), sendo um fator limitante para a produtividade agrícola. Um dos mecanismos propostos para contornar este tipo de estresse é a manipulação da expressão de genes que possibilitem o crescimento de plantas em ambientes com baixo teor de P no solo. Vários genes responsivos ao estresse de Pi já foram identificados, dentre eles o transportador de fosfato 2 (AtPT2), isolado de *Arabidopsis thaliana*. Este gene codifica para uma proteína de membrana que é expressa apenas em raízes em deficiência fósforica. Um fragmento de 2,3Kb da região 5' não codante deste gene foi capaz de direcionar a expressão do gene repórter GUS em raízes de arábido e tabaco, em condições de baixo Pi. Neste estudo, objetivando selecionar promotores, funcionais em milho, capazes de direcionar a expressão de diferentes proteínas em raízes sob o estresse de Pi, o promotor AtPT2 fundido ao gene repórter GUS foi inserido no genoma de milho, através da transformação via biobalística. Análise das plantas de milho transgênicas geradas mostraram que o promotor AtPT2 é capaz de direcionar a expressão de proteínas heterólogas sob o estresse de Pi, entretanto, a enzima  $\beta$ -glucuronidase foi detectada não apenas em raízes, mas também, em menor concentração, nas folhas das plantas transgênicas. Estes resultados sugerem que os mecanismos regulatórios relacionados com o estresse de Pi são mais conservados entre as diferentes plantas do que aqueles relacionados com a especificidade do órgão vegetal.

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

---

Comitê Orientador: Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA/ DQI (orientador); Dr<sup>a</sup> Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

## ABSTRACT

Coelho, Gracielle Teodora da Costa Pinto. **Analyses of the Gene Promoter of Phosphate Transporter from *Arabidopsis thaliana* - AtPT2 – in Maize Transgenic Plants.** 2005. 112 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

Phosphorus is one of the macronutrients required by plants that is found, often, at low concentrations in the soil (2 to 10  $\mu\text{m}$ ), being a limiting factor to the agricultural productivity. One of the mechanisms proposed to ameliorate this type of stress is the manipulation of the expression of genes that enable plant growth in a low P environment. Several genes that respond to the Pi stress have been identified, among them the phosphate transporter 2 (AtPT2), isolated from *Arabidopsis thaliana*. This gene encodes a transmembrane protein that is expressed in roots under phosphate deficiency. A 2,3 Kb fragment of 5' untranslated region from this gene were able to direct the expression of GUS reporter gene to the arabidopsis and tobacco roots, in low Pi conditions. In this study, aiming to select promoters, that function in maize, able to direct different proteins expression to roots under Pi stress, the AtPT2 promoter fused to the GUS reporter gene was integrated to the maize genome throughout the biolistic transformation. Analyses of the transgenic maize plants generated show that the AtPT2 promoter is able do direct the expression of heterologous protein under Pi stress, however, the  $\beta$ -glucuronidase enzyme was detected not only in roots but also, at lower concentration, in leaves of transgenic plants. These results suggest that the regulatory mechanisms related to the Pi stress are more conserved amongst plants than the ones related with the organ specificity.

**Key-works:** promoter, transgenic, abiotic stress, maize, reporter gene

---

**Guidance Committee:** Dr. Luciano Vilela Paiva, UFPA/ DQI (orientador);  
Dr<sup>a</sup> Andréa Almeida Carneiro (co-orientadora), Embrapa Milho e Sorgo.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, solos ácidos são freqüentes na região que compreende o Cerrado, área que cobre uma extensão de 205 milhões de hectares (ha), dos quais 112 milhões são aptos à agricultura. Os Cerrados respondem por 25% da safra brasileira de milho, soja e arroz, entre outros grãos cultivados em uma área de 12 milhões de ha. A baixa fertilidade destes solos é um dos maiores problemas para o desenvolvimento agrícola e a produção de alimentos.

O milho é uma importante cultura nacional. Produzem-se, atualmente, em nosso país, cerca de 42.000 toneladas anuais (IBGE, 2005), sendo o Paraná, Minas Gerais e São Paulo os três maiores estados produtores. No mundo, o país ocupa a terceira colocação, perdendo apenas para os Estados Unidos e China (Anuário, 2004).

O grande desafio para a elevação do rendimento agrícola e o aumento da competitividade do milho produzido no Brasil é o ajuste de sistemas de produção, de forma a atender condições produtivas e de uso. Dentre esses aspectos, podem ser citados produção de forragem para alimentação bovina, plantio direto, safrinha e produção de grãos com maior resistência a pragas, doenças e em condições de estresse mineral e ambiental (Lopes, 2005). Entre os estresses minerais, ou deficiências nutricionais, observados no cultivo do milho, as que mais se destacam são a deficiência de fósforo e nitrogênio.

A aquisição de fósforo é primordial para o crescimento e o desenvolvimento da planta, desempenhando importante papel em funções básicas, como a formação de ácidos nucleicos, fosfolípidios (Raghothama, 1999), metabolismo energético e regulação enzimática através de cascatas de transdução de sinais, entre outros (Rausch & Bucher, 2002). No entanto, o fosfato inorgânico (Pi) é um dos nutrientes que raramente se apresenta, no solo natural, em quantidades necessárias requeridas pelas plantas (Abel et al., 2002),

além de se apresentar de forma menos disponível em solos ácidos, encontrado freqüentemente em concentrações similares à dos micronutrientes. Na sua forma complexada, Pi não é liberado no solo e se encontra indisponível para a planta (Delhaize & Ryan, 1995; Kochian, 1995). Solos de regiões tropicais e subtropicais apresentam ligantes naturais ao Pi, o que indisponibiliza cerca de 80% do P adicionado à terra por meio da adubação, gerando um gasto quatro vezes maior em adubos fosfatados para os produtores (Raghotama, 1999).

A produção de variedades de plantas mais adaptadas a estes tipos de solos, obtidas por melhoramento clássico ou engenharia genética, pode ser uma das soluções para resolver os problemas de fertilidade de solos e, principalmente, do Cerrado, diminuindo a adubação fosfatada e, por conseguinte, diminuindo também os altos custos e os impactos ambientais gerados pelo seu residual. Além disso, estima-se uma durabilidade de, no máximo, 90 anos para as fontes de P utilizadas para a produção de suprimentos agrícolas (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghothama, 1999).

O enorme progresso alcançado pela biologia molecular e celular nos últimos anos permitiu o isolamento e a caracterização de genes que codificam para transportadores de fosfato, fosfatases e promotores específicos para diferentes tecidos, que respondem ao estresse de Pi. Estes genes podem ser utilizados para gerar cultivares transgênicas mais eficientes na absorção e remobilização do fósforo presente em solos, deficientes em Pi, como por exemplo, o Cerrado brasileiro (Fuente et al., 1997; Muchhal et al., 1996; Raghothama, 1999). Muchhal et al. (1996) isolaram cDNA de *A. thaliana* em inanição de fosfato, descrevendo os genes AtPT1 e AtPT2 como transportadores de fosfato, sendo que a expressão de AtPT2 foi detectada apenas em raízes. Estes autores mostraram a similaridade destes genes que codificam para proteínas transportadoras com outros transportadores de fosfato já descritos em *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa* e *versiforme*.

Buscando comprovar a especificidade de direcionamento de diferentes genes à raiz e a ativação em deficiência de Pi destes promotores, Karthikeyan et al. (2002) transformaram *A. thaliana*, uma dicotiledônea, com três diferentes genes repórteres, GUS ( $\beta$ -glucoronidase), LUC (luciferase) e GFP (proteína fluorescente verde), fundidos a ambos promotores AtPT1 e AtPT2, e comprovaram a atividade tecido específica do AtPT2 sob o estresse de Pi. Já a ativação do AtPT1 também observada sob estresse de Pi, não apresentou especificidade apenas para raiz.

O promotor AtPT2 poderia ser utilizado para direcionar a expressão de genes relacionados à tolerância ao estresse de Pi, como por exemplo, ácidos orgânicos e transportadores de Pi nas raízes de milho, reduzindo assim o custo energético, em carbono, de plantas crescendo sob estresse fosfórico. Estudos de promotores tecidos específicos visando o melhoramento de plantas através de técnicas de engenharia genética vêm sendo desenvolvidos por vários grupos de pesquisas em todo o mundo (Liu & Ekramoddoullah, 2003, Schünmann et al., 2004, Winicov et al., 2004), e resultados promissores têm sido alcançados. Promotores tecidos específicos e / ou ativos apenas em situações de estresses, que possam ser utilizados na geração de cultivares mais tolerantes, diminuindo os gastos com produção, e garantindo o uso sustentável dos solos, tornam-se cada vez mais importantes, uma vez que o seu uso evitaria gastos desnecessários de energia para a planta.

Neste estudo, foi analisada a capacidade do promotor do gene transportador de fosfato AtPT2, isolado de *A. thaliana*, de direcionar a expressão do gene repórter GUS, em raízes de plantas transgênicas de milho sob o estresse de Pi. O objetivo geral deste trabalho foi encontrar um promotor raiz específico, ativado apenas em condições de estresse de Pi, que possa ser usado para direcionar a expressão de diferentes genes que conferem tolerância ao estresse de Pi em milho. Para tanto, uma seqüência de 2.300 pb da região 5' não-codante

do gene AtPT2 foi isolada através de amplificação por PCR e subclonada na frente da região codante do gene repórter GUS ( $\beta$ -glucuronidase). Esta construção gênica foi transferida para plantas de milho pelo processo da biobalística.

O estudo deste promotor, em milho, mostra-se importante, uma vez que, o AtPT2 foi caracterizado como tecido específico, ativo em deficiência de Pi, em um sistema heterólogo, *A. thaliana*. Se atuar da mesma forma em milho o AtPT2, poderá ser utilizado no melhoramento genético do milho, gerando cultivares mais tolerantes às situações de solo do Cerrado brasileiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do milho

Milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais produzidos no mundo. O Brasil é um dos maiores produtores, com cerca 41.900.000 toneladas do grão, perdendo, em número, apenas para a soja, que apresentou produção de 49.521.531 toneladas na safra de 2004 (IBGE, 2005). Durante as últimas décadas, a produção anual de milho, em toneladas, foi semelhante à do arroz e do trigo (O'Connor-Sanchez et al., 2002).

De acordo com Huang & Wei (2004), o milho é um cereal cuja cultura vem crescendo extensamente no mundo. Hoje, trata-se da forragem mais importante entre os cereais, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento. O milho é o cereal que apresenta o maior número de produtos industrializados. Sua utilização na alimentação é bem diversificada devido ao alto conteúdo de amido (71,5%) e teores significativos de proteínas (10,3%), lipídeos (4,8%) e açúcares (2,%). Características, como sua fácil digestibilidade, riqueza em amido e baixo custo, tornam esta cultivar amplamente empregada como fonte de energia (Lopes, 2005)

Milhões de pessoas em regiões tropicais e subtropicais do mundo dependem do milho para sua subsistência. Nestas áreas, é frequentemente baixa a produtividade nas colheitas, devido a estresses bióticos e abióticos, como seca, toxicidade de alumínio e ou escassez de nutrientes (O'Connor-Sanchez et al., 2002).

A limitação da terra produtiva, os recursos de água, os estresses ambientais e o grande crescimento da população ocasionam uma grande demanda no aumento da produção de milho, bem como sua qualidade (Huang & Wei, 2004), mesmo diante das limitações produtivas geradas pela acidez dos solos. Kochian et al. (2004) afirmam que 20% da safra mundial de milho é oriunda de solos que apresentam acidez, o que demonstra que o melhoramento convencional já avançou muito no aumento da produtividade e da tolerância a estas características dos solos. No entanto, o uso da biotecnologia poderá aumentar ainda mais esta produtividade.

## 2.2 Fósforo

O fósforo (P) é um macro nutriente essencial para o crescimento e o desenvolvimento de todos os organismos. Ele está envolvido em funções básicas como formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de transdução de sinais (Abel et al., 2002; Rausch & Bucher, 2002; Schünmann et al., 2004). Podendo desta forma, ser considerado o maior fator limitante para o desenvolvimento de plantas em ecossistemas naturais, de forma que, para garantir a sobrevivência em solos com baixas concentrações de P, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de adaptação (Muchal, 1999; Karthikeyan et al., 2002 e Hammond et al., 2004).

Estes mecanismos de adaptação são observados como modificações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, tais como modificações

na anatomia da raiz, acúmulo de pigmentos de antocianina, secreção de fosfomonoesterases e ácidos orgânicos na rizosfera (Fan et al., 2003; Ligaba et al., 2004; Lopez-Bucio et al., 2000; Rausch & Bucher, 2002). Os mecanismos de adaptação podem ser uma resposta à modificação do metabolismo de C (carbono) na planta durante períodos de deficiência fosfórica (Vance et al., 2003).

Estudos realizados com plantas de tabaco sob deficiência Pi demonstraram alterações na produção de compostos de carbono e na demanda de carbono assimilado, regulados pela fotossíntese (Pieters et al., 2001). Plantas sob deficiência de Pi apresentaram uma queda fotossintética de 25%, mesmo em condições de saturação interna de CO<sub>2</sub>. Estas mesmas plantas, sob condições de deficiência de Pi, em situação de luminosidade parcial, apresentaram um aumento nas taxas de exportação de sacarose das folhas, o que ocasionou o aumento de glicose-6-fosfato e gerou o aumento da sacarose fosfato sintase (SPS) responsável pela reciclagem do Pi, buscando manter a taxa fotossintética, já que se encontrava exposta a duas deficiências. Este efeito não foi observado em plantas Pi-suficientes nas mesmas condições. Estes resultados mostram que a baixa luminosidade em plantas sob estresse de Pi limita ainda mais a fotossíntese e, conseqüentemente, limita a produção de compostos de carbono essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento da planta. Diminuição na taxa fotossintética da planta gera queda de fotoassimilados.

Concomitantemente à baixa produtividade, estes dados mostram uma das causas do fosfato ser considerado o nutriente de maior importância para a agricultura (Abel et al., 2002; Lopes-Bucio et al., 2000).

A disponibilidade de P em terras nativas raramente é adequada para ótimo crescimento e sua assimilação, armazenamento e metabolismo são processos altamente regulados que afetam diretamente o crescimento, desenvolvimento e, conseqüentemente, a produção da planta (Abel et al., 2002).



De acordo com Almeida (2002), depois do N (nitrogênio), o Pi (fósforo) é o nutriente que mais limita a produtividade no Brasil, constituindo, em média, 0,2% do peso seco total das plantas. No entanto, não se pode considerar o N sem o Pi, pois este exerce uma grande influência no metabolismo do N. Gomes et al. (2001) mostraram, em estudos realizados com alfafa, que a supressão de Pi reduziu significativamente os teores de aminoácidos totais nas folhas e nas raízes em todos os estádios do desenvolvimento. Estes resultados indicam que houve alteração no processo de fixação do  $N_2$  e que a glutamato sintase dependente de NADH (NADH-GOGAT) foi extremamente sensível à baixa disponibilidade de Pi, sugerindo que a supressão do Pi pode exercer controle na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo do N durante os diferentes estádios do desenvolvimento de alfafa.

Não obstante, a deficiência Pi pode gerar diversos distúrbios metabólicos que levam à queda da produtividade e até à inviabilidade da cultura. Wasaki et al. (2003a) enumeram estas mudanças metabólicas como (1) aceleração da provisão de carbono para síntese de ácidos orgânicos por meio da glicólise, (2) alterações do metabolismo de lipídio, (3) remobilização de fosfolipídios da parede celular, e (4) mudanças de expressão de genes relacionados à resposta para elementos metálicos, como o Al, Fe e Zn. Como forma de proteção em situação de estresse causado por indisponibilidade de Pi, toxicidade por Al, baixa disponibilidade de Fe e a exposição a metais pesados, em algumas plantas observa-se um aumento notável na síntese e exsudação de vários ácidos orgânicos através das raízes, buscando garantir a assimilação do Pi (Delhaize et al., 1993; Delhaize & Ryan, 1995; Larsen et al., 1998; Ligaba et al., 2004; Neumann et al., 2000; Ryan et al., 1997). Em solos ácidos, o fosfato apresenta baixa disponibilidade por estar complexado ao Al; o fosfato pode se tornar insolúvel e, portanto, indisponível para as plantas, se precipitado também com o Fe e o Ca (Rausch & Bucher, 2002). Furtini Neto et al. (2001) descrevem a quelagem do Pi ao cálcio em pH

superior a 7,0 e ao Al e Fe em pH próximo de 5,0 e concluem que o pH que apresenta maior número de moléculas de Pi livres para a absorção radicular seria mais próximo de 6,0.

O uso indiscriminado de fertilizantes à base de Pi buscando resolver problemas de solos, como baixa fertilidade e baixa disponibilidade de Pi, vem aumentando progressivamente desde 1960 (Vance et al., 2003). Se o aumento do consumo de adubos fosfatados continuar acontecendo, prevê-se que as fontes se esgotem até 2050 (Güsewell, 2004; Lenton, 2001; Raghutama, 1999; Vance et al., 2003); o uso de adubo fosfatado tem causado danos incomensuráveis ao meio ambiente e a lixiviação destes fertilizantes gera eutrofização (Raghutama, 1999) e hipoxia (Vance et al., 2003), degradando os ecossistemas aquáticos.

### 2.3 Assimilação e remobilização do fósforo

O fósforo é essencial para a reposição de partes chave de moléculas como os ácidos nucleicos, fosfolípides, ATP e compostos ativadores de outras funções biológicas. Sua deficiência pode influenciar em todo o metabolismo da planta, levando a uma queda drástica do seu crescimento e a uma diminuição exponencial de sua produção (Lopes-Bucio et al., 2000). Dessa forma, o conhecimento exato do controle de formas de aquisição de fosfato pelas plantas poderá gerar colheitas com alto rendimento em regiões de baixa disponibilidade de fosfato e baixa aplicação de fertilizantes (Rausch & Bucher, 2002).

Proteínas seletivas de membrana são responsáveis pela entrada e remobilização de muitos nutrientes minerais e metabólitos oriundos do exterior e de diversas partes da planta, como de tecidos e outros compartimentos celulares. De acordo com Rausch & Bucher (2002), as plantas são capazes de acumular Pi e outros nutrientes em suas células. O transporte destes nutrientes se dá através de proteínas específicas conhecidas como transportadores de membrana.

Diversos transportadores de membranas para fosfato são estudados, atualmente, buscando otimizar a assimilação deste nutriente, e muito se discute sobre a regulação da transcrição dos genes que codificam para estes transportadores de fosfato em plantas. Muchhal & Raghothama (1999), afirmaram que transportadores de fosfato são, geralmente, constituintes de membrana plasmática de células de raízes ativos pela inanição de fosfato. O fosfato é adquirido pela planta por meio de mediação do sistema de contra-transporte iônico na membrana plasmática através da  $H^+$ /ATPases. A liberação de prótons se dá em sua maioria através de uma bomba  $H^+$ /ATPase localizada na membrana plasmática (Vance et al., 2003). Esta proteína de membrana utiliza ATP para bombear prótons para o meio extracelular, criando pH ideal e diferenças no potencial elétrico no plasmalema (Vance et al., 2002; 2003). Yan et al. (2002) demonstraram aumento na atividade catalítica da membrana plasmática pela  $H^+$ /ATPase de raízes em deficiência fosfórica, o que pode ser responsável pelo aumento em extrusão de  $H^+$  (Figura 1).

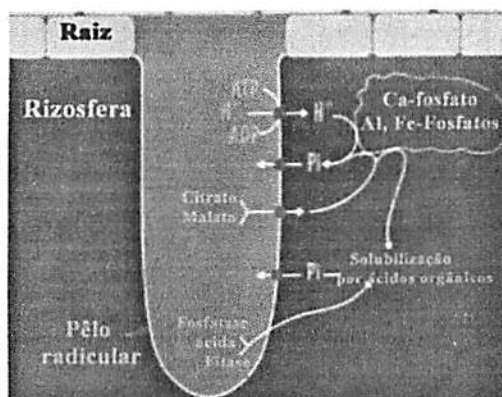


FIGURA 1: Adaptações bioquímicas que acontecem em raízes envolvendo extrusão de prótons e carboxilatos na rizosfera através da plasmalema. Bomba de  $H^+$ /ATPase e canais de ânio. Fonte: Adaptado de Vance et al. (2003)

A deficiência de  $Pi$  induz à exsudação rápida de ácidos orgânicos (AO) através da ativação de proteínas de canal aniônico seletivo em locais onde ocorre a exsudação (Neumann et al., 1999; Uhde-Stone et al., 2003; Vance et al., 2002).

Lópes-Bucio et al (2000), demonstraram a exsudação de malato e citrato, quando em excesso no citoplasma, para o meio extracelular por proteínas carreadoras de membrana ou armazenamento destes ácidos orgânicos no vacúolo. Sas et al. (2001), demonstraram que o aumento da exsudação de AO é causado pela deficiência de Pi e está associada à extrusão de  $H^+$ . Estes autores afirmaram, ainda, que o percentual de exsudação de AO acontece em ordem de 90% citrato e 10% malato. Nesta situação acontece um aumento na formação de raízes antes do início do declínio da planta causado pela deficiência fosfórica. A liberação de ácidos orgânicos permite a quelagem do  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$  e  $Ca^{2+}$  ao ácido orgânico e o conseqüente deslocamento de Pi destas ligações ou precipitação do Pi (Hinsinger, 2001; Jones, 1998; Ryan et al., 2001). O Pi também é susceptível à liberação dos quelados através da hidrólise efetuada por fosfatases (Vance et al., 2002).

Como resposta à deficiência na interface solo-raiz, três sistemas de resposta participam da translocação de fosfato nas plantas. Estes mecanismos buscam aumentar os níveis de fosfato durante o período de privação: (i) liberação fosfato no xilema nas raízes, (ii) carreadores de fosfato são ativos no sistema vascular e, (iii) modificação no ciclo do pólen, cita-se como exemplo a senescência (Bucher et al., 2001). Outros mecanismos, como remobilização de reservas de fosfato, estão presentes em plantas. A presença de fosfatases em plantas é marcante e elas destacam-se no metabolismo da planta com diversas funções, como, por exemplo, fitases, responsáveis pela hidrólise do Pi do inositol durante a germinação; fosfoglicolato-fosfatase, que catalisa a conversão do P-glicolato a glicolato; 3-fosfoglicerato (3-PGA)-fosfatase esta enzima catalisa a hidrólise do 3-PGA, possivelmente oriundo de uma rota secundária como glicerato, a serina ou a glicolato; fosfoenolpiruvato-fosfatase, enzima que compete com a piruvato-quinase pelo PEP-fofoenolpiruvato em condições de estresse fosfórico e fosfotirosil-proteína-fosfatase, enzima que incorpora, por meio de sua proteína, o Pi (Duff et al., 1994).

Algumas fosfatases estão incluídas nas enzimas responsáveis pelo metabolismo da glicose, como frutose-1,6-bifosfatase e sacarose-6-P fosfatase. Segundo Ragothama (1999) e Uhde-Stone et al. (2003), durante a deficiência de Pi, enzimas que não requerem nucleotídeos fosfatados ou Pi em seu substrato são ativadas. Estas enzimas são consideradas enzimas adaptativas da resposta glicolítica em deficiência de Pi; são chamadas “bypass reaction” (via de contorno de reações) e, funcionam como uma via de escape para economizar Pi, evitando os passos da glicólise que requerem Pi e adenilato, permitindo o metabolismo do carbono durante a Pi-deficiência (Figura 2).

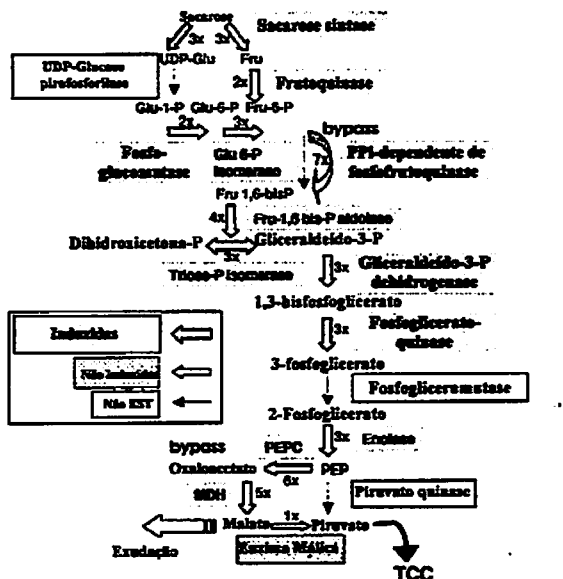


FIGURA 2: Representação esquemática da glicólise. ESTs que induzem a expressão em raízes em estresse de Pi, comparadas com raízes sem estresse de Pi, estão representadas nas caixas cinzas. Enzimas da via glicolítica que não foram observadas nas análises de microarrays estão representadas nas caixas brancas e por setas de linhas pontilhadas. Enzimas não induzidas representadas em caixa listrada. Adaptado de Uhde-Stone et al., 2003.

## 2.4 Promotores e regulação gênica

Expressão gênica refere-se ao processo em que a informação codificada por um determinado gene é decodificada em uma proteína. Este processo só é possível através da ativação de promotores que definem quando, como e onde um gene deve ser expresso. Define-se por promotor a seqüência mínima necessária para que a transcrição se inicie corretamente (Lewin, 2001). A seqüência promotora está localizada na extremidade 5' não-codante do sítio de início da transcrição (Rombauts et al., 2003), podendo esta variar de tamanho.

Mudge et al. (2003), em estudos de deleção do promotor do gene *Pht1* de *A. thaliana* sob inanição de Pi, observaram que 300pb da região 3' não-codante são suficientes para direcionar a expressão raiz específica deste gene. No entanto, estes autores descreveram um aumento no nível de expressão quando este promotor apresenta-se com 2000 pb. Estudos como este comprovam a existência de motivos CAREs (elementos regulatórios cis-ativadores), regiões de pequenas seqüências conservadas, entre 5 a 20 nucleotídeos, encontradas na região promotora, regulando a expressão deste gene. No entanto, elementos regulatórios podem estar localizados tanto nas extremidades 5' ou 3', em relação à região codante do gene (Rombauts et al., 2003).

Mudge et al. (2003) descrevem introns que aumentam a expressão de genes em deficiência de Pi e afirmam, ainda, que seqüências semelhantes a destes introns estão presentes no gene transportador de fosfato *Pht1*. Zhang et al. (1994) também relatam introns que funcionam como elementos regulatórios, como o primeiro intron de um gene que está sendo expresso. Estes resultados mostram que seqüências do próprio gene podem regular sua expressão.

Um promotor pode ser dividido em duas partes, uma proximal e outra distal ao sítio de início de transcrição (Rombauts et al., 2003). A parte proximal parece estar relacionada ao encaixe do complexo da RNA polimerase II e pelo

controle da expressão em níveis basais de transcrição (Lewin, 2001). Estas seqüências basais constituem os elementos conhecidos como TATA Box, reguladores mais comuns em promotores de genes de organismos eucarióticos.

Associados à iniciação da transcrição, através da RNA polimerase II e também à seqüências TATA, os elementos-*cis* aumentam ou diminuem a expressão gênica (Figura 3) (Bassett et al., 2004). Hidalgo & Demple (1997) mostraram a importância de elementos-*cis* na regulação gênica, na expressão do gene *soxS* em *Escherichia coli*. A presença de elementos reguladores da expressão gênica também foi detectada por Mudge et al. (2003) em estudo de deleções do promotor Pht1;2 de cevada. Liu & Ekramoddoullah (2003) afirmam que a especificidade dos promotores está relacionada ao tamanho da região promotora. Estes dados podem ser comprovados através de experimentos de deleções nos promotores e mostram que a especificidade do promotor pode estar relacionada à sua região distal.

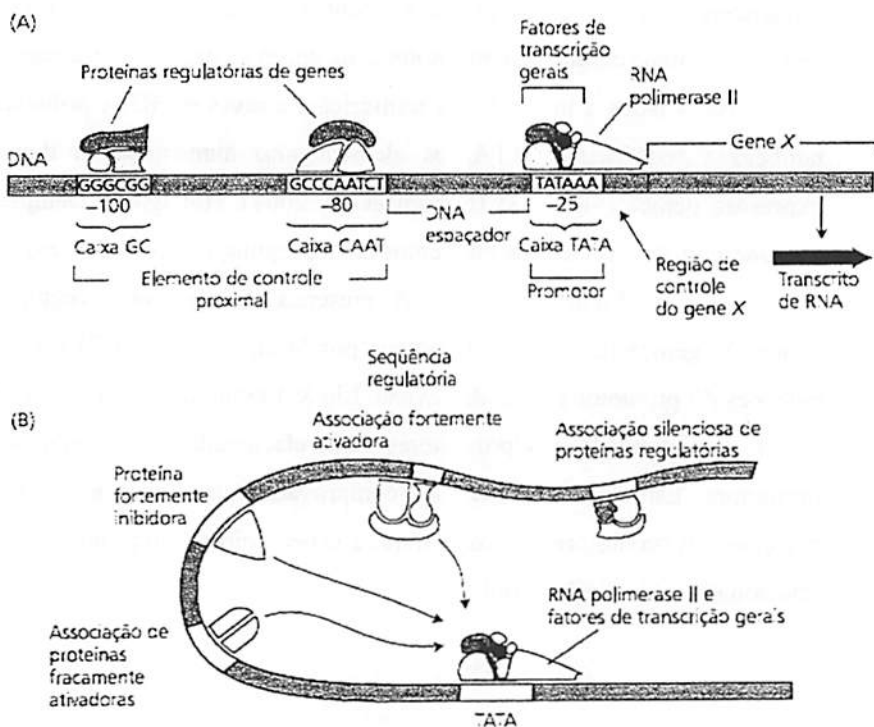


FIGURA 3: Organização e regulação de um gene eucariótico típico. (A) Características de um promotor mínimo de uma RNA polimerase II eucariótica típica e proteínas que regulam a expressão gênica. A RNA polimerase II está situada na caixa TATA, em associação com os fatores de transcrição gerais, cerca de 25 pb upstream do sítio de partida da transcrição. Duas seqüências regulatórias de ação *cis*, que acentuam a atividade da RNA polimerase II, são a caixa CAAT e a caixa GC, localizadas, a aproximadamente, 80 e 100 pb em upstream do sítio de partida da transcrição. As proteínas de DNA que se ligam a esses elementos estão indicadas. (B) Regulação de transcrição por seqüências regulatórias distais e fatores de ação *trans*. Os fatores de ação *trans* ligados às seqüências regulatórias distais podem atuar combinados para ativar, acentuar ou inibir a transcrição, por meio do contato físico direto com o complexo de iniciação da transcrição. Fonte: Taiz & Zeiger, 2004.



Os promotores podem ser diferenciados em (i) constitutivos, aqueles que permitem a expressão de genes de forma geral conforme a exigência do metabolismo do organismo em relação a um produto final, por exemplo, uma proteína, e (ii) específicos, que permitem a expressão gênica de forma espaço-temporal específicas (Lewin, 2001), favorecendo uma economia energética ao organismo. A especificidade de um promotor está diretamente relacionada à presença de motivos ou regiões que são responsáveis pela regulação da expressão gênica. Segundo Rombauts et al. (2003), partes distais do promotor podem conter elementos regulatórios com ação espaço-temporal, definindo, desta forma, a especificidade do promotor.

A transcrição de um gene é regulada por seqüências (elementos *cis*) no promotor (elemento regulador ou elemento de resposta) ou no estimulador (*enhancer*). Essas seqüências regulatórias do promotor são reconhecidas por proteínas específicas, conhecidas como fatores transcrpcionais, que são necessárias para que a RNA polimerase inicie a transcrição. Segundo Rombauts et al. (2003), fatores de transcrição ligam-se em regiões regulatórias (*CAREs*) e coordenam a iniciação da transcrição; este ponto de controle é de extrema importância para a regulação da expressão gênica. Vance et al. (2003) descrevem a modulação do gene PHO pela ação dupla de fatores *trans* e *cis*. Neste caso, a indução da resposta à deficiência de Pi envolve a percepção de proteínas que catalisam a autofosforilação; o fator-*trans* modula a resposta de ligação específica ao elemento *cis* em promotores responsivos a deficiência de Pi nos PHO-boxes.

Raghotama (1999), descreveu que, elementos ligantes a PHO-boxes ocorrem somente em resposta à deficiência de Pi induzindo a expressão de genes. Um elemento *cis* identificado em promotores de genes responsivos à deficiência de Pi foi 5'-CACGT(G/T) (Hammonde et al., 2004; Rhagutama, 1999).

Shünmann et al. (2004a), identificaram motivos potencialmente envolvidos na expressão de genes de raiz responsivos à deficiência de P, usando a comparação entre seis seqüências de genes Pht1 presentes no GenBank [HvPht1;1 (AF543197), HvPht1;2 (AY187019), HvPht1;4 (AY187024), HvPht1;5 (AY187021), HvPht1;6 (AF543198), e HvPht1;7 (AY187022)]. A região P1BS (GNATATNC) encontrada em *A. thaliana* (Rubio et al., 2001) foi identificada por Schünmann et al. (2004a) nos promotores HvPht1 de cevada responsivos à deficiência de Pi, que apresentavam múltiplas cópias deste motivo em HvPht1;1, HvPht1;2 e HvPht1;7.

O controle da expressão de uma proteína acontece em diferentes níveis segundo Lewin (2001) e Taiz & Zeiger (2004): (i) impedindo ou possibilitando a expressão do gene (regulação relacionada ao promotor), (ii) definindo como um transcrito primário de RNA é processado (*splicing*), (iii) selecionando quais mRNAs serão traduzidos, e (iv) ativando ou inativando seletivamente as proteínas depois da sua síntese. Daish et al. (2003) demonstraram que regiões regulatórias do promotor são de grande importância para o direcionamento correto da expressão do gene. Partes da região promotora podem funcionar como *enhancers* e silenciadores (Liu & Ekramoddoullah, 2003), indicando que a especificidade do promotor está em suas regiões regulatórias. Segundo Mudge et al. (2003), a especificidade dos promotores está relacionada com o número de nucleotídeos conservados entre promotores, na região que antecede o início da transcrição (*upstream*), indicando a presença de *enhancers* que auxiliam no controle da transcrição.

#### 2.4.1 Genes e promotores induzidos pela deficiência fosfórica em raiz

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos buscando encontrar genes e promotores responsivos ao Pi, que possam ser utilizados para a obtenção de

plantas melhoradas por meio da engenharia genética. Até o presente momento, alguns genes e promotores responsivos ao Pi já foram descritos: AtPT2 e AtPT1 de *A. thaliana* (Muchhal et al., 1996); família PHO de *Saccharomyces cerevisia* (Oshima et al., 1996); LePT1 e LePT2 de tomate (Daram et al., 1998 e Liu et al., 1998); Pht2;1 de *A. thaliana* (Daram et al., 1999); AtIPS1 e At4 de *A. thaliana* (Martín et al., 2000); PHR1 de *A.thaliana* e PSR1 de *Chlamydomonas reinhardtii* (Rubio et al., 2001); LaPt1 e LaPt2 de *Lupinus albus* (Liu et al., 2001); OsPI1 de arroz (Wasaki et al., 2003b); Pth1;2 de *A. thaliana* (Mudge et al., 2003); TPS11 de tomate e Mt4 de *Medicago truncatula* (citados em revisão - Hammond et al., 2004); LaPT1 Liu et al. (2005) e LaSAP1 Miller et al. (2001) de *Lupinus albus*,

Os genes AtPT1 e AtPT2 codificam para proteínas transmembrana com 12 domínios, separados em dois grupos de seis, devido à presença de região hidrófila. Estes genes são expressos sob deficiência fosfórica, especificamente em raiz, AtPT2, e preferencialmente em raiz, AtPT1. Karthikeyan et al. (2002), transformaram *Arabidopsis thaliana* com os promotores AtPT2 e AtPT1, direcionando a síntese dos genes repórteres luciferase (LUC), *green fluoescence protein* (GFP) e  $\beta$ -glucuronidase (GUS). Estes autores observaram a atividade do promotor AtPT2 em todo o sistema radicular somente quando a planta estava em deficiência de fósforo. Já o promotor AtPT1 direcionou a expressão dos genes repórteres em toda a planta, tanto na presença quanto na ausência de fósforo, no entanto a expressão do gene aumenta em índices mais baixos de fósforo. Muchhal (1996), em trabalho com *Arabidopsis thaliana* transformadas com AtPT2, descreve este gene como um promotor raiz específico que é ativado em condições de inanição de fosfato.

Em *Saccharomyces cerevisia*, Oshima et al. (1996) descreveram a família PHO relacionada ao controle da síntese de fosfatase, em situação de baixo Pi. De acordo com estes pesquisadores, pelo menos cinco genes desta

família estão relacionados à síntese em situação de inanição: PH02, PH04, PH080, PH081 e PH085. Os autores sugerem, ainda, a presença de seqüências *cis*-regulatórias (Tabela 1) relacionadas à ativação pela deficiência de Pi nos promotores dos genes PHO2 (GCACGTGGG) e PHO4 (GCACGTTTT), que podem estar presentes em diferentes promotores também relacionados à ativação de genes em situação de baixa disponibilidade de Pi (Oshima et al., 1996, Hammond et al., 2004).

Os genes *LePT1* e *LePT2* codificam para proteínas transmembrana de 12 domínios que são expressas sob condições de deficiência fosfórica (Daran et al., 1998; Liu et al., 1998). Daran et al. (1998) descrevem o funcionamento do promotor *LePT1* como transportador transmembrana de íons Pi, agindo como bomba de  $Pi/H^+ATPase$ . A expressão destes genes é observada no ápice de raízes de plantas sob estresse. Entretanto, de acordo com Liu et al. (1998), *LePT1* pode também ser observado em folhas sob estresse de nitrogênio, potássio e ferro, apesar de direcionar uma forte expressão em raízes sob estresse fosfórico, diferentemente do *LePT2*, que somente se expressa em raízes sob estresse fosfórico.

A expressão do gene *Ph2;1* foi observada em *A. thaliana*, em situação de deficiência fosfórica em raízes, por Daran et al. (1999). A expressão do gene *Ph2;1* não está restrita a raízes, entretanto este promotor dirige uma forte expressão deste gene em raízes quando em estresse fosfórico (Daran et al., 1999). De acordo com os autores, a proteína codificada por este gene possui dois boxes de 8 e 9 aminoácidos que são altamente conservados entre espécies de bactérias, fungos, plantas e animais. Esta proteína é comumente expressa em tecidos verdes, como folhas, mas, sob deficiência fosfórica, observa-se um aumento considerável de sua incidência em raízes.

Rubio et al. (2001) induziram mutação sementes de *A. thaliana* transgênica, contendo a construção *AtIPS1::GUS*, visando observar alterações

na expressão do gene repórter. O promotor AtIPS1 é responsivo à deficiência fosfórica (Martín et al., 2000). Mutantes alteradas em respostas à regulação a deficiência de Pi, foram isolados, e o gene PHR1, que codifica para um fator de transcrição, foi clonado. Sua expressão foi localizada no núcleo em condições de suficiência de fósforo. Apesar disto, o gene PHR1 apresentou homologias com outros genes relacionados à deficiência de Pi, como o PSR1 de *Chlamydomonas reinhardtii* e os genes da família PHO. PHR1 possui *domains* de ligação de DNA da superfamília MYB, o que sugere a formação de dímeros de proteína ligantes ao DNA. Em análises do promotor AtIPS1, Rubio et al. (2001), demonstram a presença de seqüências palindrômicas de ligação dos dímeros de PHR1. Os autores concluíram que provavelmente, este gene agiria no final da cascata de resposta a inanição de Pi.

Os genes LaPT1 e LaPT2 codificam para proteínas transmembrana transcritas sob deficiência fosfórica. Estes dois genes apresentam uma homologia de 75% nas suas seqüências e, codificam uma proteína de 12 domains. Em situação de forte estresse fosfórico, observa-se a expressão de LaPT1 em raízes apenas, no entanto, sob baixa deficiência sua expressão é também observada em caules e folhas. Já o LaPT2 que se mostrou fortemente expresso em deficiência fosfórica, foi também detectado em suprimento de fósforo e apresentou nível de expressão similar quando sob estresse de Al, Mn e N (Liu et al., 2001).

Os genes LaPt1 e LaPt2 de *Lupinus albus* são transportadores de membrana, onde LaPT1 é expresso somente em inanição de fosfato. Apresentam homologia a outros promotores, como LePT1 e LePT2 de tomate (Liu et al., 1998), AtPT2 de *Arabidopsis thaliana* (Muchhal et al., 1996) e MtPT2 de *Medicago truncatula*. A homologia na seqüência com AtPT2 chega a 83,4% (Liu et al., 2001). Estes dados indicam que promotores ativados em situação de deficiência fosfórica possuem seqüências responsivas similares a este estresse.

Wasaki et al (2003b) buscando isolar genes ativos em condições de estresse de Pi descreveram o gene *OsPI1* (*Oryza sativa Phosphate-limitation 1 inducible gene 1*), constituído por 375pb sem a cauda poli-A. O transcrito foi identificado imediatamente após a indução da deficiência. Os autores também mostraram haver pequenas ORFs (*Open Reading Frames*) conservadas entre este gene e outros genes ativos em situação de deficiência Pi, como o *TPS11* de tomate, *Mt4* de *Medicago truncatula*, *AtIPS1* e *At4* de *A. thaliana* (Martín et al., 2000) (Figura 4). Estes mesmos genes foram citados por Hammond et al. (2004) como ortólogos, em revisão de seqüências regulatórias de genes ativos sob deficiência de Pi.

		*****	*****	
<i>OsPI1</i>	155	TAGGCAGGTCGCTAGGCTACG*TAGGCAACTAAACAACCTTGGCAGGTCTTCTCTCTCAGACT		216
<i>TPS11</i>	177	-GT*GT*...TT*CT*GTC*AA.....CTTACC.....CT*TGATGGAGGAA...CG-		239
<i>Mt4</i>	276	-GATCG*...TT*GCTCTG*AA.....TCCATC.....CT*TT*ATC...CT*ATC		337
<i>At4</i>	429	-T*CT*TT*...T*TC*CT*TT*.....TCCATC.....ACT*CGG...CT*CGG-		493
<i>AtIPS1</i>	216	-T*CT*TAAT*CT*CT*TAGAA*CT.....CTTACC.....ACT*CGG...CT*CGG-		277

FIGURA 4: Regiões conservadas relacionadas a respostas a Pi - deficiência entre as famílias de genes. Asteriscos representam as bases coincidentes. Fonte: Wasaki et al. (2003b)

O promotor *Pht1;2* induz expressão gênica sob condições de deficiência fosfórica, nas células da epiderme da raiz, nas raízes jovens em formação (ápice) e nos pêlos radiculares (Mudge et al., 2002). Mudge et al. (2003), estudaram o promotor de *A. thaliana Pht1;2* (transportador de fosfato), direcionando a expressão do gene que codifica para a enzima fitase de *Aspergillus niger* e constataram o seu potencial em direcionar a expressão de genes em deficiência fosfórica. De acordo com os resultados apresentados por estes pesquisadores, esse promotor poderá ser usado para direcionar genes que possam melhorar a captação de P em plantas sob estresse.

Liu et al. (2005), transformaram plantas de alfafa com as construções *LaPT1::GUS* e *LASAP1::GUS* com o objetivo de analisar a expressão do gene

repórter sob controle destes promotores. O promotor do gene transportador de fosfato LaPT1 e o promotor do gene secretor da fosfatase ácida LaSAP1 de *Lupinus albus*, foram descritos como ativos em deficiência fosfórica por Liu et al. (2001) e Miller et al. (2001). Liu et al. (2005), comprovaram a ativação deste promotor apenas sob deficiência fosfórica em raízes de alfafa, um sistema heterólogo ao da leguminosa *L. albus*.

**Tabela 1:** Ocorrência de elementos *cis*-regulatórios em promotores de genes ativos em deficiência de Pi.

Elementos responsivos ao P	Seqüências
PHO-like	C(G/T/A)(C/T/A)GTGG
TATA box like	TATAAATA
TC element	TCTCTCT
NIT 2-like	AAATATCT
PHR1 element	GNATATNC
PHO element	CACGT(G/C)
P responsive	ATGCCAT
Helix-loop-helix	CA(T/G)(A/C)TG
NIT 2	TATC(A/T)(A/T)

(Adaptado de Hammond et al., 2004)

#### 2.4.2 Fatores de transcrição

Fatores de transcrição são peças chave na expressão de genes e, de acordo com os dados apresentados por muitos autores, não aparecem apenas ativando genes ou controlando seu nível de expressão. Esses fatores são responsivos a diferentes estresses e parecem ser conservados entre várias espécies. Chen et al. (2002) descrevem 402 diferentes fatores de transcrição em *A. thaliana* sob várias condições de estresse. Dentre estes, 121 são constituintes da família MYB. Wu et al. (2003) afirmam que muitos genes expressos na fotossíntese e na assimilação de nitrogênio são regulados por fatores de transcrição.

Segundo Wu et al. (2003), mais de 100 genes entre fatores de transcrição e proteínas sinalizadoras são regulados durante a inanição de Pi. Hammond et al.

(2003) descrevem dois elementos *cis* regulatórios comuns em promotores de genes de *A. thaliana* expostas à deficiência fosfórica por 4 horas, em análises de microarray. Ainda neste trabalho, os pesquisadores descrevem a expressão de cinco fatores de transcrição na região 5' não codante, do tipo "zinc finger" (Lewin, 2001), responsáveis por ativação e acentuação da transcrição, após as plantas serem mantidas em 4 horas de inanição de P. Também descreveram a presença de fatores de transcrição na região 3' após 100 horas de inanição. Schindler et al. (1992) descrevem fatores de transcrição do tipo "zipper" como reconhecedores de seqüências ACGT presentes em muitos promotores; a classe de fatores de transcrição bZIP destas proteínas e elementos G-Box assemelha-se a proteínas de *A. thaliana* que reconhecem a seqüência (CACGTG) em PHO, uma família gênica responsiva ao Pi em microrganismos.

De acordo com Schünmann et al. (2004), em estudos relacionados à resposta do promotor HvPht1;1 de cevada em arroz transgênico submetido a baixos níveis de fósforo, promotores com seqüências entre e 856 e 1.400 nucleotídeos apresentam sua expressão máxima. Seqüências entre -856 e -547 em relação ao início da transcrição são necessárias para expressão em células epidérmicas e a região proximal ao *start* códon de 0 a -194 são essenciais para a expressão nos ápices das raízes.

Em estudos realizados com genes repórteres GFP, GUS e LUC fundidos ao promotor AtPT2, Karthikeyan et al. (2002), demonstraram que elementos-*cis* são responsáveis pela ativação do promotor AtPT2 em situação de estresse fosfórico em *Arabidopsis* e tabaco.

Bassett et al. (2004), trabalhando com o promotor do gene *inrpk1* de *Ipomoea Nil* e estudando as seqüências regulatórias deste promotor, mostraram que a freqüência de expressão em raízes pode ser aumentada de 25% para 50% a 70% em plantas de acordo com o tamanho e quantidade de seqüências regulatórias associadas ao TATA-Box.



### 2.4.3 Genes de microrganismos que ativam promotores raiz-específicos relacionados com a deficiência fosfórica

Microrganismos simbiotes são de grande importância para as plantas e vice-versa, podendo garantir o acesso a assimilados já parcialmente metabolizados e até proteínas sinalizadoras que gerem respostas a estresses ambientais em troca de metabólitos que as plantas podem oferecer. Estas “trocas” podem garantir a sobrevivência de ambas as espécies em algumas situações. Buscando demonstrar como esta relação de convivência é primordial para muitas espécies, muitos pesquisadores vêm estudando respostas metabólicas relacionadas à espécie simbiote.

Rausch et al. (2001), demonstraram que a simbiose pode, em alguns casos, conferir à planta resistência à deficiência fosfórica por meio da ativação de promotores raiz específicos por proteínas produzidas pelo microrganismo.

Rausch & Bucher (2002), afirmaram que genes, como o StPT3, descrito por Rausch et al. (2001) como transportador de fosfato de batata, apresentam características moleculares e bioquímicas de indução por micorrizas em simbiose com a planta, já que existe homologia entre o promotor deste gene e aqueles de genes da família Pht1 (de plantas) e da família PHO (de fungos). Todos estes genes estão relacionados à aquisição de fosfato. Hibridação *in situ* demonstraram um aumento na atividade do gene StPT3 quando a planta em situação de deficiência fosfórica estava colonizada por *G.intraradices*.

Liu et al. (2005) demonstraram que os promotores de *Lupin white* LaPT1 e LaSAP1 dirigiram a atividade diferencial de GUS em nódulos de simbiose com fixadores de nitrogênio em plantas transgênicas. Em condições de baixo Pi, o promotor LaSAP1 direcionou a expressão do GUS, principalmente na zona de fixação de nitrogênio, mostrando menos atividade de GUS na zona de infecção.

Em nódulos de plantas transformadas com promotor LaPT1, observou-se uma atividade preferencial em tecidos vasculares. A indução de atividade do promotor por deficiência de Pi por fixadores de N relaciona-se com a expressão de genes de assimilação de N em nódulos (Liu et al., 2005).

Genes de microrganismos vêm sendo usados para aumentar a tolerância à deficiência ao fósforo. De acordo com Richardson et al. (2001), o gene PhyA de *Aspergillus niger* sob o comando do promotor viral constitutivo CaMV35S foi utilizado para transformação de *A. thaliana*. Plantas transgênicas codificando a enzima fitase apresentaram um aumento na absorção de fósforo através da degradação do fitato em Pi. Estes resultados também foram observados por George et al. (2005) utilizando o mesmo cassete em tabaco.

Análise do promotor PHO, que regula genes ativos em deficiência de P em *Saccharomyces cerevisiae*, revelou dois consensos elementos *cis*-reguladores, GCACGTGGG e GCACGTTTT, para PHO2 e PHO4, que controlam a expressão de genes relacionados com a deficiência de P (Oshima et al., 1996). Elementos *cis*-reguladores, semelhantes, para levedura PHO4, foram identificados em dois genes de plantas responsivos à deficiência de Pi, TPSI1 de tomate e Mt4 de *Medicago truncatula* (Hammond et al., 2004).

Estudos detalhados de mecanismos regulatórios da expressão de genes, na interação plantas e microrganismos, podem revelar como ocorrem estas sinalizações intracelulares e como estas informações são recebidas e processadas, no controle à resposta em baixa disponibilidade de Pi.

## 2.5 Métodos para introdução de genes em plantas

Melhoristas de plantas dependem de variabilidade genética existente na natureza como matéria-prima para o desenvolvimento de cultivares melhoradas. O melhoramento tradicional conta apenas com características presentes na

espécie que podem ser manipuladas e transferidas sem atravessar as barreiras biológicas que definem as espécies. Desta forma, os melhoristas ficam restritos a manipulações no cruzamento de indivíduos para a obtenção do carácter desejado. Melhoria genética de colheitas foi alcançada tradicionalmente por hibridação sexual entre espécies em numerosas cultivares com rendimentos altos e desempenho agrônômico superior. Obtenção de plantas via melhoramento convencional, às vezes combinada com técnicas de citogenética clássica, continua sendo o método principal de melhoria de cultivares de cereal (Repellin et al., 2001).

O advento da tecnologia de DNA recombinante e a possibilidade de transformar plantas permitem o acesso a um novo e variado "pool" de genes e possibilitam a transferência de genes além dos limites permitidos pelo melhoramento tradicional, segundo Repellin et al. (2001). Devido a esta nova tecnologia, foram superadas barreiras no cruzamento e, genes de fontes sem conexões ficaram disponíveis para ser introduzidos assexuadamente em plantas.

Além de permitir incorporação de genes de interesse provenientes de outra espécie vegetal, microbiana ou animal, é possível manipular *in vitro* os genes próprios da espécie para, por exemplo, alterar seu nível de expressão, o momento de ativação ou modificar a expressão tecido-específica com uma finalidade determinada (Batty & Evans, 1992; Christou, 1995; Ishida et al., 1996; Offringa et al., 1992; Wang et al., 1995).

A primeira espécie a expressar genes manipulados foi o tabaco (*Nicotina tabaco*), cujas plantas foram transformadas utilizando vetores de *Agrobacterium tumefaciens* (Marton et al., 1979; Rogers et al., 1986). A transformação foi confirmada pela presença de seqüências de DNA exógenas nos transformantes primários e sua progênie, e por um fenótipo de resistência ao antibiótico canamicina conferido por um gene quimérico de neomicina fosfotransferase. Estes primeiros experimentos de transformação utilizavam com freqüência

protoplastos como células receptoras. O desenvolvimento posterior de métodos de transformação baseados em explantes regeneráveis como folhas, meristemas e raízes contribuiu significativamente para a transformação fácil e rotineira de muitas espécies de dicotiledôneas (Bytebier et al., 1987; Deroles et al., 1988; Graves et al., 1987).

Como as monocotiledôneas sempre se mostraram bastante recalcitrantes à transformação por este sistema vários métodos de transformação com DNA livre, como a microinjeção, eletroporação e biobalística (transformação via gene-gun), foram desenvolvidos (Batty & Evans, 1992; Christou, 1995; Offringa et al., 1992; Wang et al., 1995).

## 2.6 Transferência de genes usando biolística

Em uma tentativa de solucionar alguns dos problemas relacionados com transformações de plantas usando *Agrobacterium tumefaciens*, especialmente as limitações relacionados com hospedeiro específico, foi desenvolvida a transformação usando biobalística (Klein et al., 1987). A biobalística é baseada na transformação de células usando micropartículas de tungstênio ou ouro revestidas com o DNA de interesse. Usando equipamentos especiais denominados "*particle gun*", as micropartículas são atiradas e penetram a parede celular e as membranas sem matar as células (Klein et al., 1987). Em geral o tecido que é bombardeado pode ser regenerado e plantas transgênicas são produzidas. Numerosos trabalhos de pesquisa têm sido publicados demonstrando a viabilidade da técnica de biobalística para a transformação de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

Gordon-Kamm et al. (1990) e Fromm et al. (1990) foram os dois grupos precursores da produção de plantas transgênicas de milho utilizando biobalística. Estes pesquisadores obtiveram plantas férteis de milho transformadas e demonstraram a possibilidade de se transferir os genes introduzidos para a

progênie. 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 (Armstrong & Green, 1995) 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).

Casas et al. (1993) publicou um protocolo de regeneração e transformação de *Sorghum bicolor* usando biobalística. Entretanto, apenas 0.3% dos embriões usados produziram calos que eram embriogênicos.

Trigo transgênico foi produzido por Loeb & Reynolds (1994) a partir de micrósoros bombardeados com construções gênicas contendo um dos seguintes promotores, 35S, ubiquitina do milho ou Zm 13 (pólen específico), e o gene repórter GUS. O promotor da ubiquitina foi o que rendeu melhores resultados; 21 dias após o bombardeamento dos micrósoros atividade do GUS foi detectada em embriões em desenvolvimento. O processo de transformação usando biobalística não afetou a germinação dos micrósoros de trigo (Loeb & Reynolds, 1994).

Trigo transgênico também foi gerado após o bombardeamento de embriões com partículas de ouro revestidas com a construção gênica composta do promotor da actin-1 e do gene repórter GUS. Doze plantas de trigo transgênicas foram produzidas a partir de 1050 embriões bombardeados. Quatro destas plantas foram crescidas em casa de vegetação até a maturidade e produziram sementes férteis (Becker et al., 1994).

Cereal transgênico (*tritordeum*) foi também obtida por Barcelo et al. (1994) usando a técnica da biobalística. Inflorescências imaturas de *Tritordeum* foram bombardeadas com a construção gênica contendo o gene repórter GUS

sobre o controle do promotor da actin1-D de arroz (pAct1-Dgus). As plantas recuperadas foram positivas em análises de *Southern blot* e em análises histoquímicas para a detecção do GUS. Plantas transgênicas foram colocadas em casas de vegetação e cresceram até a maturidade normalmente produzindo flores e sementes.

Embriões de aveia bombardeados com partículas de ouro revestidas com o gene repórter GUS sobre o controle do promotor *Adh1* de milho, germinaram normalmente e produziram quatro plantas transgênicas a partir de 90 plantas analisadas (Rítala et al., 1994).

Buscando otimizar sistemas de transformação via biobalística atualmente muitos pesquisadores vêm descrevendo diferentes protocolos. Um novo sistema para a produção de milho transgênico de genótipos tropical e subtropical, a partir do bombardeamento de calos organogênicos, foi desenvolvido por O'Connor-Sánchez et al. (2002). Estes pesquisadores conseguiram transformar e regenerar seis genótipos diferentes de milho tropical.

Tadesse et al. (2003) trabalharam com otimização de protocolos de transformação via biobalística em sorgo (*Sorghum bicolor*), testando parâmetros físicos incluindo pressão de aceleração das partículas e distância das micropartículas dos explantes, neste trabalho os pesquisadores transformaram embriões, calos e brotos de sorgo.

Brandão et al. (2005) desenvolveram um protocolo de regeneração embriônica de *Sorghum bicolor* a partir de inflorescência imatura altamente eficiente. Utilizando este protocolo, o grupo conseguiu transformar este cereal através da biobalística com uma eficiência em torno de 1%.

A biobalística tem se mostrado um método promissor para a introdução de novas e desejáveis características em cereais. Vários protocolos de regeneração e transformação de cereais usando a técnica da biobalística estão sendo publicados. Atualmente, esta técnica tem sido, rotineiramente, utilizada

na produção de milho transgênico pelo Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo (Carneiro et al., 2003; Carneiro et al., 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação do explante e cultura de tecidos

Embriões imaturos, entre 1,0 – 1,5 mm de comprimento (8 a 16 dias após polinização, foram colhidos de plantas produzidas nos campos experimentais da Embrapa Milho e Sorgo). As sementes utilizadas nestes experimentos foram da linhagem temperada A188, com uma alta capacidade regenerativa em cultura de tecido. Espigas foram esterilizadas utilizando 50% água sanitária comercial e 0,01% Tween 20, durante 40 minutos e então enxaguadas 3 vezes com água destilada estéril. Embriões imaturos foram isolados e cultivados com o eixo embrionário em contato com o meio de cultivo (Figura 5). Estes embriões foram usados para iniciar culturas de calos embriogênicos.

Embriões imaturos da linhagem A188 foram cultivados em meio de indução de calos – CI [N6 sais e N6 vitaminas (Chu et al., 1975), 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 2,87 g L<sup>-1</sup> prolina, 100 mg L<sup>-1</sup> caseína hidrolizada, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 2,5 g L<sup>-1</sup> phytigel, 1,7 mg L<sup>-1</sup> nitrato de prata, 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D]. O pH foi ajustado para 5,8 com hidróxido de sódio 1N, antes do meio ser autoclavado. Nitrato de prata (nitrato de prata, 2 mg L<sup>-1</sup>), esterilizado por filtração, foi adicionado após autoclavagem. Estes calos foram iniciados um mês antes do bombardeamento, com intervalos de 10 dias de subcultivo.



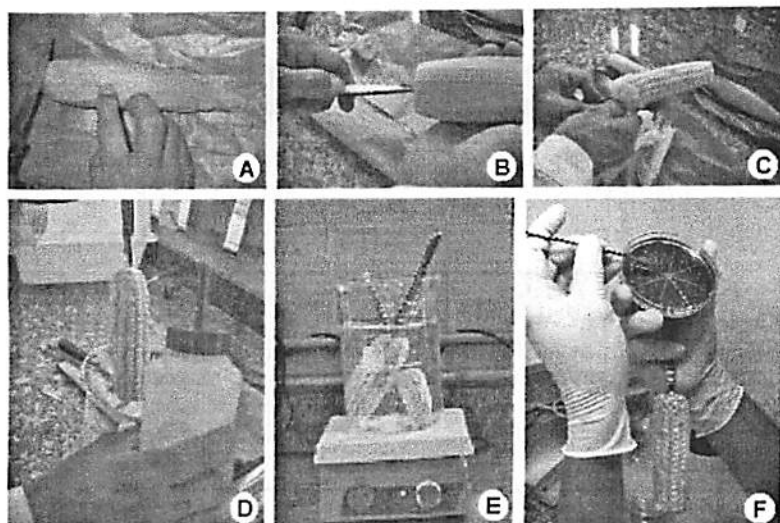
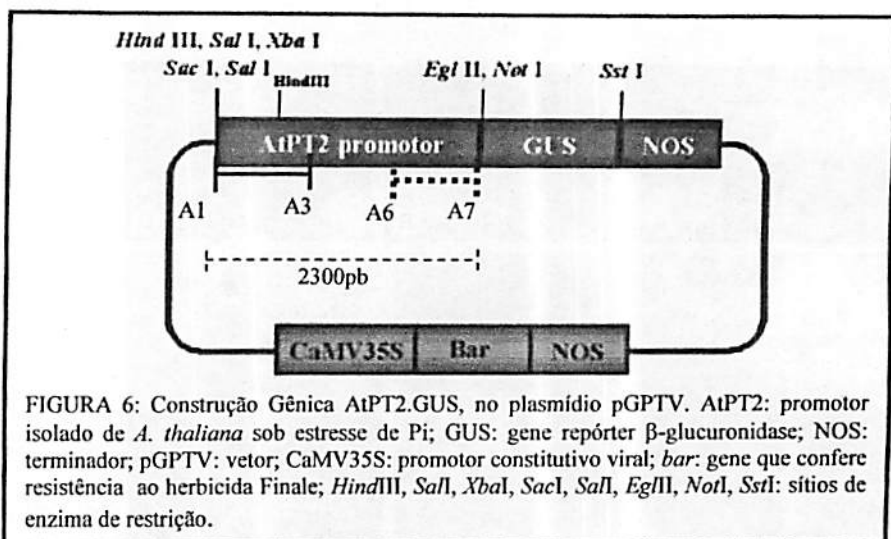


FIGURA 5: Plaqueamento de Embriões Imaturos em Meio de Cultivo. (A) As extremidades de uma espiga de milho, coletada aproximadamente 2 semanas após a polinização, são cortadas; (B) Uma pinça é inserida na extremidade posterior da espiga pa a facilitar o manejo; (C) A espiga é despalhada; (D) Etanol é utilizada para um enxágüe inicial; (E) Espigas são imersas em solução de hipoclorito de sódio comercial 50%, sob agitação constante; (F) A superfície da espiga é cortada com o auxílio de um bisturi, expondo o endosperma, e os embriões imaturos são coletados, em ambiente estéril, e plaqueados em meio de cultivo.

### 3.2 Construções gênicas

Para a produção de milho transgênico via biobalística utilizou-se uma seqüência de 2300 bp da região 5' não codante do gene *AtPT2*, isolada do gene transportador de fosfato de *Arabidopsis thaliana* através de amplificação por PCR. Esta região foi utilizada para direcionar a expressão do gene repórter *GUS*, presente no plasmídeo *pGPTVbar*. Esta construção gênica foi cedida pelo Dr. Raghotama da Universidade de Purdue (Figura 6). Os DNAs plasmidiais usados nos experimentos de bombardeamento foram purificados por gradiente de cloreto de césio como descrito por Sambrook et al. (1989).



### 3.3 Bombardeamento de Partículas

Calos embriogênicos foram bombardeados com micropartículas de tungstênio usando um canhão gênico acelerado pelo gás hélio (Figura 7a e 7b).

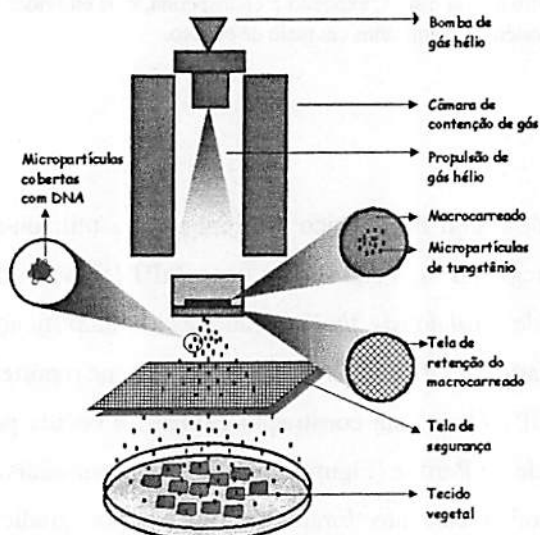


FIGURA 7a – Transferência direta de genes através do processo de biobalística

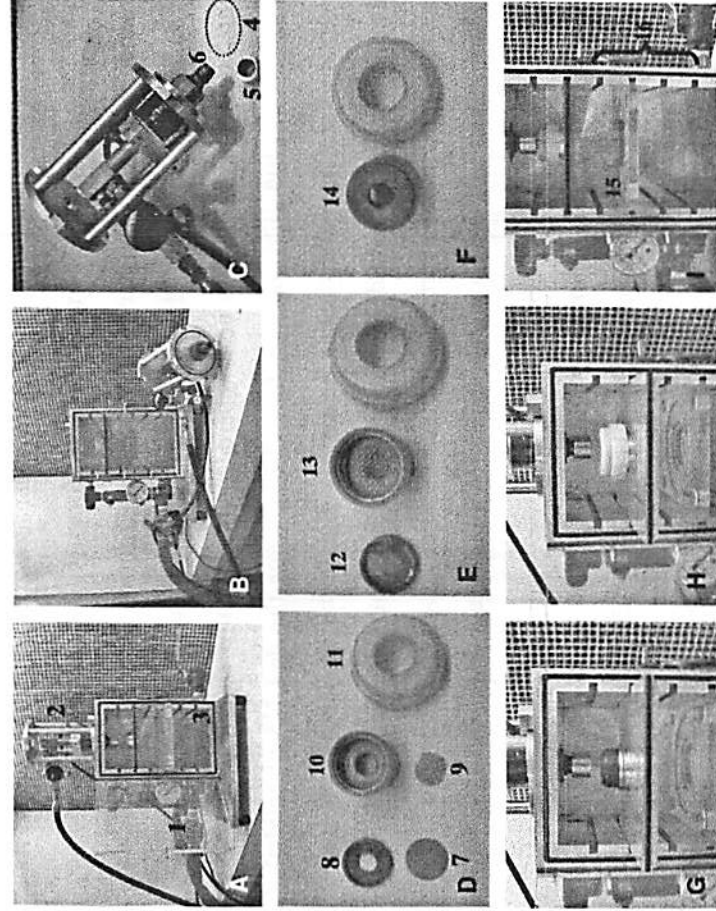


FIGURA 7b: Gene Gun Utilizado para a Transfêrencia Direta de Genes. A: Vista geral do aparelho de bombardeamento de partículas - (1) Controles para entrada de vácuo, (2) Câmara para contenção de gás hélio e controles para sua liberação, (3) Câmara de vácuo; B: Vista geral da câmara de contenção do gás hélio e da câmara de vácuo; C: Detalhamento da câmara de contenção do gás hélio - (4) Membranas de ruptura, (5) Suporte das membranas de ruptura, (6) Encaixe do suporte das membranas de ruptura dentro da câmara de gás hélio; D: Detalhe do suporte das micropartículas - (7) Membrana macrocarreadora, (8) Suporte para a membrana macrocarreadora, (9) Tela de retenção da membrana macrocarreadora, (10) Suporte da tela de retenção, (11) Dispositivo que mantém todo o conjunto unido dentro da câmara de vácuo; E, F, G e H: Montagem das peças mostradas em D, dentro da câmara de vácuo; I: Colocação dos explantes dentro da câmara de vácuo para o bombardeamento de partículas - (15) Explantes dentro de uma placa de Petri, (16) Diferentes distâncias que os explantes podem ser posicionados relativos à posição das micropartículas cobertas com DNA.

Para tal, um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuscitando 60mg tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda - USA) em 1 ml de uma solução 50% glicerol estéril. DNA plasmidial, construção (A1PT2 + GUS + NOS) contendo o gene repórter GUS sob o controle do

promotor AtPT2 -*Arabidopsis thaliana* Transportador de Fosfato 2 (Muchhal et al., 1996), foi precipitado sobre 50µl da solução estoque de tungstênio. As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspendidas em 60µl de etanol 100%. Seis microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24mm) de membranas Kapton (Du Pont). Estas membranas foram usadas no bombardeamento de calos embriogênicos de milho utilizando 1100 psi de pressão de gás hélio, 1,6µg/tiro de DNA plasmidial e os explantes foram posicionadas à 6cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidos constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA (8mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12mm) e a pressão de vácuo (27mm Hg).

Antes do bombardeamento, os explantes foram colocados em meio osmótico com 12% sacarose (meio CI + 120 g.L<sup>-1</sup> sacarose) durante aproximadamente três horas.

Bombardeamentos foram realizados em placas de Petri 60 x 15mm (Falcon 1007) contendo 30 calos embriogênicos de aproximadamente 3mm de diâmetro cada, arranjados dentro de um círculo de 35mm de diâmetro. Uma tela (100 mesh) de proteção foi colocada logo acima das placas com os explantes na hora do bombardeamento.

#### 3.4 Seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio SM suplementado com glufosinato de amônia, o composto ativo do herbicida Finale<sup>®</sup> (AgrEvo). Calos foram subcultivados a cada duas semanas em meio SM [N6 sais; N6 vitaminas (Chu et al., 1975), 2 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-

inositol, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose, 2,5 g L<sup>-1</sup> phytigel], suplementado com dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 e 9 mg L<sup>-1</sup>).

Calos que desenvolveram em meio seletivo foram transferidos para o meio RM [MS sais e vitaminas (Murashige & Skoog, 1962), 60 g L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> mio-inositol, 0,2 mg L<sup>-1</sup> ANA, 3 g L<sup>-1</sup> phytigel, pH 5.8], acrescido de 6 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia. Para regeneração, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> glufosinato de amônia e cultivados à 26°C em luz (16 horas). Plantas com aproximadamente 5cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde completaram seu ciclo reprodutivo (Figura 8).

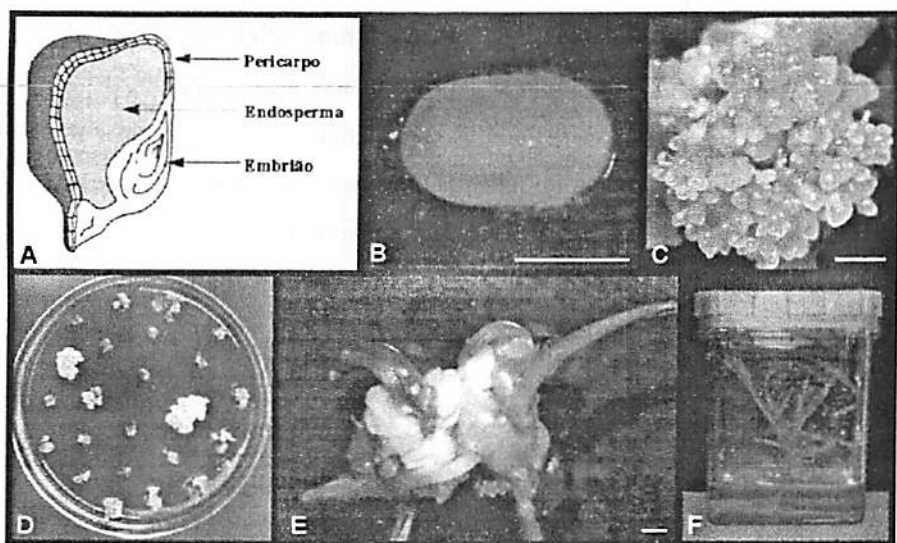


FIGURA 8: Formação de Calos Embriogênicos e Regeneração de Plantas de Milho em Cultura de Tecido. (A) Grão do Milho; (B) Embrião imaturo de milho com 2 mm; (C) Embriões imaturos após 3 semanas em meio de cultura CI; (D) Calos bombardeados crescendo em meio com agente seletivo fosfotricina; (E) Germinação de embriões transgênicos; (F) Regeneração de plantas em frascos Magentas. Barra: 1 mm

### 3.5 Análises de plantas transgênicas

#### 3.5.1 - Isolamento do DNA genômico

DNA genômico foi isolado de 38 plantas transformadas usando o método de Saghai Maroof et al. (1984). Três gramas de tecido fresco, foram macerados em N<sub>2</sub> líquido em seguida foram adicionados 10 mL tampão CTAB (20 ml Tris-HCl 1M pH 7.5, 28 ml NaCl 5M, 4 ml EDTA 0.5M pH 8.0, 2 g CTAB, completar o volume para 100 mL com água destilada, antes de usar adicionar 2% β-mercaptoetanol). A reação foi incubada a 65°C por 90 minutos e, homogeneizada a cada 15 minutos. Em seguida foram adicionados 5ml de clorofórmio/octanol (24:1), misturou se gentilmente por 10 minutos e, centrifugou-se a 10.000 rpm, por 10 minutos removendo o sobrenadante. Para eliminação total do fenol, esta etapa foi repetida duas vezes. Para precipitação do DNA adicionou-se 6 mL de isopropanol a temperatura de -20° C, e o precipitado (DNA) foi coletado com anzol de vidro. DNA foi transferido para 3mL de TE pH 8.0 (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

Para quantificação do DNA, uma alíquota foi aplicada em gel de agarose 0.8%. A quantificação foi feita através do uso de um marcador molecular de concentração conhecida (100 ng/μL) que foi aplicada juntamente com as amostras.

#### 3.5.2 PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

A presença da construção gênica AtPT2-GUS nas plantas produzidas foi confirmada utilizando PCR com os *primers* A6 X A7 (CCA GTG TCT CCG TTC ACC TT - X – GAA AAT TGC AGA GGA GAA GAA GA), gerando um fragmento de 588pb. Cada 25 μl de reação continha tampão de PCR 10X, 2 mM

de  $MgCl_2$ , 100  $\mu M$  de cada dNTP, 0,2  $\mu M$  de cada um dos primers, 25 ng de DNA e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 15 segundos, anelamento 55°C por 15 segundos e extensão 72°C por 15 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 4 min. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 Volts por 3 horas, em gel de agarose 1,5% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0.5  $\mu g/ml$ ), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene). A figura 9 ilustra a seqüência do promotor AtPT2 que foi amplificada e os primers utilizados.

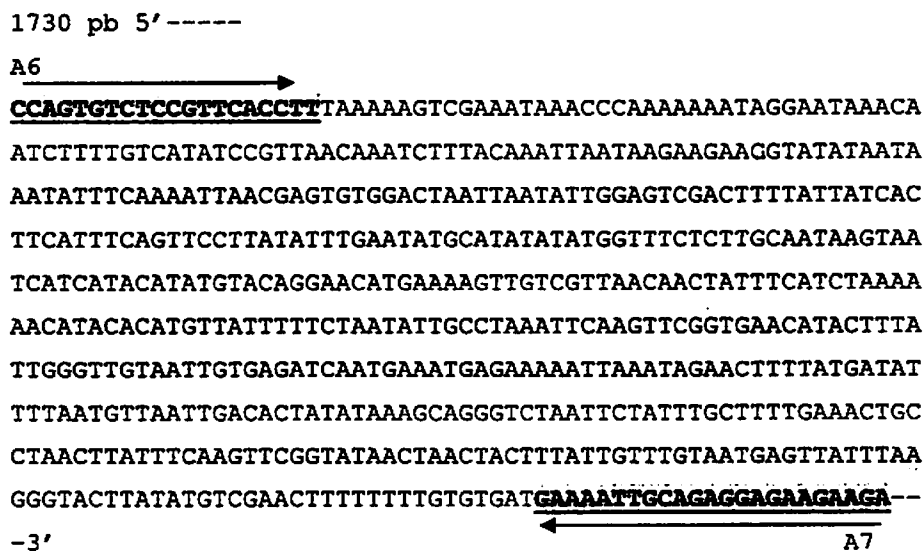


FIGURA 9: Parte da seqüência do promotor AtPT2 com descrição dos primers e seus locais de anelamento, bem como a seqüência amplificada.

### 3.5.3 Southern Blot

Para o *Southern blot* foram feitas digestões com a enzimas *HindIII*. A quantidade utilizada para as digestões foi de 20 µg de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen). A eletroforese foi feita em gel de agarose 1% utilizando tampão TAE (90 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0). Após a separação do DNA no gel, esse foi incubado em solução de HCl 0.2 N por 30 minutos, desnaturado em solução de NaOH 0.5 M contendo NaCl 1.5 M por 45 min, e neutralizado em solução Tris-HCl 0.5 M contendo NaCl 1.5 M por 30 min. Em seguida, o DNA foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schuell Inc., Keene, NH) por capilaridade através de uma ponte com papel de filtro embebidas em SSC 10X durante 16 hs. Após a transferência a membrana foi lavada em uma solução de SSC 2X, seca por 1 hora, e o DNA fixado na membrana utilizando UV crosslinker (UV Stratalinker 2400 – Stratagene) (Sambrook *et al.* 1989). O DNA foi hibridado com uma sonda para o promotor AtPT2 com 972 pb marcada com <sup>32</sup>P de acordo com as especificações do fabricante (RadPrime DNA Labelling System-Gibco BRL). A sonda foi obtida através do produto PCR, realizado com os primers A1(CCC ATT CGT GAA TGA AAA CTA CG) X A3 (CGG TGT CGT TGT TCG GAA) (Figura 6). As membranas foram pré-hibridadas em solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 M, NaCl 0.25 M, EDTA 1 mM, e SDS 7%, durante 1 hora à 68°C e hibridadas na mesma solução, acrescida da sonda de DNA denaturada, por 16 horas à 65°C. Em seguida, as membranas foram lavadas, 3 vezes por 1 hora, em solução de lavagem (SSC 1X e SDS 0.1%) como descrito por Sambrook *et al.* (1989). As membranas foram expostas em um filme de raio-X por 7 dias à -80°C.



### 3.5.4 Análise da expressão do cassete AtPT2.GUS em plantas transgênicas

#### 3.5.4.1 Análise histoquímica

Para avaliar a expressão da enzima  $\beta$ -glucuronidase (gene repórter GUS), controlado pelo promotor AtPT2, foi realizado o teste histoquímico, de acordo com a metodologia descrita por Jefferson et al. (1987). Para esse testes, sementes T0 provenientes de 10 eventos transgênicos distintos, obtidos através do processo de seleção, foram utilizadas, em um total de 8 sementes por cada evento. As sementes foram desinfestada superficialmente em 50% água sanitária comercial durante 10 minutos sob agitação. Após esta etapa foram enxaguadas em água destilada 3 vezes e colocadas para germinar em papel Germitest (J ProLab – São José dos Pinhais / Paraná), por 4 dias em água destilada sob aeração. Em seguida, as plântulas foram transferidas para solução nutritiva descrita por Magnavaca (1982) (Tabela 2). Quatro plantas de cada evento e o controle não transgênico foram transferidas para solução nutritiva incompleta - sem fósforo, e 4 plantas restantes foram mantidas em solução nutritiva completa. Após 15 dias nos diferentes tratamentos as plantas foram colhidas para análise da expressão do gene repórteres GUS.

**TABELA 2 - Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho (Magnavaca, 1982)**

**Solução nutritiva final**

Elem.	Fonte	g/L	mL esto/L	Mg elemento /L		Composição		
				Cátion	Anion	Elem	mg/L	µM
Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	270	3,08	Ca:11,1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:98,6	Ca	141,1	3527
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33,8		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N:18,2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:18,2	K	90,1	2310
K	KCl	18,6	2,31	K:22,5	Cl:20,4	Mg	20,8	855
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	44,0		K:45,8	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -S:17,7	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	152,0	10857
	KNO <sub>3</sub>	24,6		K:22,0	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:7,9	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	18,2	1300
						P	1,4	45
Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	142,4	1,54	Mg:20,8	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:24,0	S	18,8	587
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	B	0,27	25
Fé	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	20,3	1,54	Fe:4,3	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:3,3	Fé	4,3	77
	HEDTA	13,4			HEDTA:0,26	Mn	0,5	9,1
Micro			0,77			Cu	0,04	0,63
Mn	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,34		Mn:1,5	Cl:0,65	Mo	0,08	0,83
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,04			BO <sub>3</sub> -H:0,27	Zn	0,15	2,29
Zn	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,88		Zn:0,15	SO <sub>4</sub> -S:0,07	Na	0,04	1,74
Cu	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,20		Cu:0,04	SO <sub>4</sub> -S:0,02	HEDTA	20,06	75
Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,26		Na:0,04	MoO <sub>4</sub> -M:0,08			

Para a análise histoquímica da atividade de GUS, parte das folhas, raízes e colmos das plantas foram coletadas e imediatamente imersas em solução contendo 50mM tampão fosfato de sódio (pH 7.0) e 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid (Clontech, Palo Alto, CA). A reação foi incubada por 24 horas a 37°C. Buscando facilitar a visualização da expressão de GUS nos tecidos verdes, a clorofila foi retirada utilizando banhos de crescentes concentrações de etanol 20%, 40%,60%, 80% e 100%. A localização celular da atividade de GUS foi observada em cortes anatômicos, realizados a mão livre, com o auxílio de um microscópio óptico (Zeiss) e estereoscópio (Zeiss stemi SV 11).

#### 3.5.4.2 Análise fluorimétrica

Análises fluorométricas seguiram protocolo descrito por Brasileiro & Carneiro (1998). Folhas, raízes e colmos das mesmas plantas utilizados na análise histoquímica foram coletadas também para as análises fluorométricas. Para o ensaio fluorométrico toda a água utilizada na preparação das soluções foi destilada, deionizada e autoclavada, buscando anular qualquer influência externa. Plantas foram maceradas em tampão de extração (tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7.0; EDTA 500mM, pH 8.0; Sarcosil 15%, Triton 100X -10%,  $\beta$ -Mercaptaenol). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e logo após adicionou-se tampão de extração na proporção 1:5 (para 100 mg de amostra : 500 $\mu$ L do Tampão de Extração); foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos em centrífuga Marca Eppendorf Modelo 5415C, o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Uma alíquota foi retirada para quantificação da proteína em espectrofotômetro (UV/VIS Spectrometer Lambda Bio – Perkin Elmer) pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram acondicionadas em geladeira a 4°C.

Para quantificar a fluorescência, as amostras foram colocados em tubos de microcentrifuga 150µL de tampão de reação (MUG – 4-metilumbeliferil β-D-glucoronedio, 2mM – 1,76mg de MUG em 2mL de tampão de extração), os microtubos foram acondicionados durante 10 minutos à 37°C, para estabilizar a temperatura do Tampão de Reação. Transcorridos 10 minutos adicionou-se 50µL da amostra e estes foram mantidos à 37°C durante os seguintes tempos de 0, 15, 30, 45, 60 minutos. Destas reações foram retiradas alíquotas de 20µL e, adicionou-se a estas alíquotas 980µL de tampão de parada ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ H}_2\text{O}$  0,2M; solução MU – 4-metilumbeliferona 1mM pH 8,0). A leitura da fluorescência foi realizada em fluorometro DyNA quant 200 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA). O aparelho foi zerado e calibrado com a leitura do Branco e das concentrações subseqüentes de MU seguindo a curva padrão (MU 1mM em 10 ml de água - Concentração Final 1µM ; MU 1µM em 1.900 de tampão de parada - concentração final 50nM) conforme instruções do fabricante.

### 3.5.4.3 RT-PCR

#### 3.5.4.3.1 Obtenção do RNA total

Para a extração do RNA total, 0,5 gramas de tecido foliar ou de raiz, triturados com nitrogênio líquido foram adicionados 750µL de tampão de extração (100 mM Tris HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 1 M NaCl; 0,1% SDS; 1% βmercaptoetanol; 1 mM ácido aurintricarboxílico) e 750µL de fenol. A solução foi homogeneizada em vortex por 5 minutos, centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos à 4 °C em centrífuga (Centrifuge 5402 – Eppendorf). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril e para cada 1 mL do sobrenadante foram adicionados 170µL de cloreto de lítio-DEPC 12M. As amostras foram mantidas à 4°C por 16 horas, em seguida foram homogeneizadas

em vortex por 2 minutos e depois centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4 °C . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 500 µL de água ultrapura-DEPC. Foram adicionados 25µL de NaCl –DEPC 5M e 2 volumes de etanol 95% gelado. As amostras foram mantidas a -80°C por 30 minutos, e em seguida centrifugadas a 13.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 30 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC.

A quantificação do RNA foi feita utilizando espectrofotômetro (UV/VIS Spectrometer Lambda Bio – Perkin Elmer) em um comprimento de onda de 260-280nm. Uma alíquota de 1µg / µL do RNA total foi corrida a 200 volts, durante 15 minutos, em gel de agarose 2% com brometo de etídio para verificar a qualidade do RNA. O gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado no equipamento Eagle Eye II, (Stratagene).

#### 3.5.4.3.2 RT-PCR: Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase

Um volume de 2µL do RNA total foi tratado com 1µL (10U/mL) de DNase I (Amershan) a 37°C por 30 minutos. A DNase foi então inativada a 65°C por 10 minutos. Na reação de transcrição reversa para a obtenção do cDNA, 6µL água DEPC, 0,5µg Oligo DT (Invitrogen), 2,0µg RNA total e 3,33mM dNTPs foram incubados a 65°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados a esta reação 5µL tampão 5X First-Strand (Invitrogen), 0,1M DTT (Invitrogen), 40U RNase Out (Gibco). A reação foi então pré-incubada por 2 minutos a 42°C, a enzima Super Script II 200U (Invitrogen) foi adicionada e, a reação foi incubada por mais 1 hora a 42°C. Uma PCR foi então realizada a partir do cDNA produzido amplificando um fragmento de 400pb referente à expressão da enzima β-glucoronidase. Para cada reação de PCR de 25µL foram utilizados: 2,5µL tampão de PCR 10X, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 100µM de cada dNTP, 0,2µM de cada um dos primers, cDNA e 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen).



As reações foram feitas utilizando um termociclador modelo 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) programado para uma desnaturação inicial de 15 segundos a 94°C, seguido de 42 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos e extensão 72°C por 30 segundos, seguido de uma extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese a 100 Volts por 1 hora, em gel de agarose 2% utilizando tampão TAE (90mM tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8.0). Os géis foram tratados com brometo de etídeo (0.5 µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e as imagens capturadas e estocadas em um sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene).

#### 3.5.4.3.3 Análises de seqüências do promotor

As análises de seqüências presentes no promotor, comparação com fatores de transcrição encontrados em outros promotores, foi realizada utilizando-se o programa *Genamics Expression, Sequence Analysis Package*, versão 1.7.0.0 (<http://genamics.com/expression>)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho realizou-se a análise do funcionamento do promotor AtPT2 isolado de *Arabidopsis thaliana*, em plantas transgênicas de milho. O gene AtPT2, que codifica para uma proteína transmembrana transportadora de fosfato, foi isolado de uma biblioteca preparada com mRNA extraído de raízes de *A. thaliana* sob estresse de fosfato (Muchal et al. 1996). Seu promotor foi inicialmente, estudado por Karthikethyan et al. (2002) em *A. thaliana* transgênicas. Estes autores estudaram a expressão de diferentes genes repórteres sob a regulação do promotor AtPT2 classificando-o como raiz-específico, ativo apenas sob deficiência fosfórica. Com o objetivo de estudar o funcionamento deste mesmo promotor, AtPT2, em um sistema heterólogo a construção gênica contendo o promotor AtPT2 direcionando a expressão do gene repórter GUS, foi inserida no genoma do milho, através da biobalística, e sua expressão analisada.

### 4.1 Obtenção de explantes por cultura de tecidos

Duas semanas após o plaqueamento de embriões imaturos da linhagem A188, com aproximadamente 1,5 mm de comprimento, em meio CI, observou-se o início da formação de calos embriogênicos friáveis do tipo II (Armstrong & Green, 1995). Estes calos foram subcultivados, a cada duas semanas, no mesmo meio visando o aumento do número de calos embriogênicos do tipo II, para serem utilizados nos experimentos de biobalística (Figura 10). A eficiência de produção de calos embriogênicos com a linhagem A188, neste trabalho, foi de 83%. Bronsema et al. (2001) observaram a formação de calos embriogênicos na linhagem temperada de milho, A188, após 14 dias de cultivo em meio CI, confirmando os resultados encontrados neste trabalho.

O'Connor-Sánchez et al. (2002) descrevem o início da formação de calos, a partir de sementes germinadas, tanto embriogênicos quanto

organogênicos de milho após quatro semanas de cultivo em meios de cultura contendo auxina e citocinina. Coelho et al. (2005) trabalhando com linhagens tropicais de milho obtiveram 20% de formação de calos embriogênicos do tipo II, oriundos de embriões imaturos medindo entre 1,5 - 2,0 mm, subcultivados também em meio CI. De acordo com Carneiro et al. (2004) uma regeneração eficiente dos explantes é primordial para se obter sucesso na produção de plantas transgênicas, pois em média a eficiência de transformação é da ordem de 0,01%.

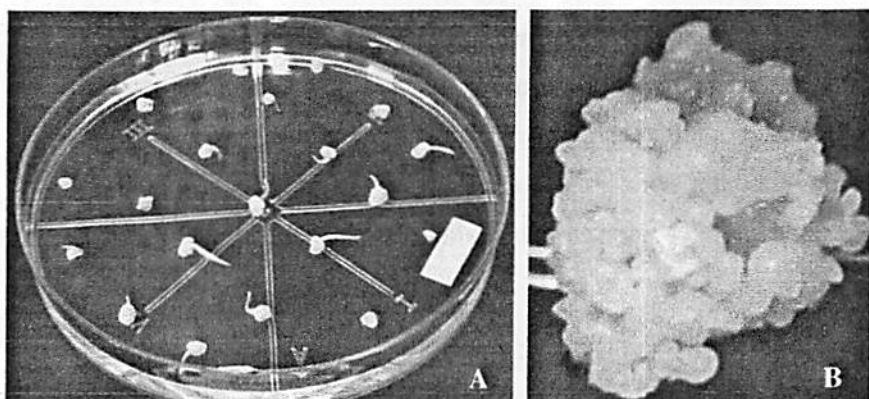


FIGURA 10: Formação de calos embriogênicos a partir de embriões imaturos de milho temperado A188. (A) Embriões após 7 dias de cultivo em meio CI; (B) Calo embriogênico formado a partir dos embriões imaturos.



#### 4.2 Bombardeamento de partículas, seleção dos explantes bombardeados e regeneração de plantas

Após o bombardeamento os calos embriogênicos foram imediatamente transferidos para meio CI sem seleção, onde permaneceram por uma semana, após este período iniciou-se a seleção das células que receberam o transgene. Os calos bombardeados foram transferidos para o meio de seleção SM suplementado com  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  PPT (glufosinato de amônia), neste meio observou-se uma diminuição no crescimento dos calos em geral. Depois de 15 dias todos os calos foram subcultivados em meio MS suplementado com  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  PPT. Nesta etapa de seleção, cerca de 80% dos calos apresentaram início de necrose e parada no crescimento. Calos que continuaram a crescer, após duas semanas de cultivo em meio suplementado com  $6 \text{ mg.L}^{-1}$  PPT, foram subcultivados em meio SM suplementado com  $9 \text{ mg.L}^{-1}$  PPT.

Nesta fase os calos possivelmente transformados, que receberam o transgene e o integraram genoma, cresceram normalmente. Calos capazes de crescer neste meio, foram transferidos para o meio de maturação RM suplementado com  $6 \text{ mg L}^{-1}$  PPT, e mantidos, em regime de luz por 16 hs, em um período que variou de 10 a 15 dias, de acordo com a maturação dos calos.

Calos maduros, com aparência branco opaca, foram transferidos para o meio de regeneração, MS suplementado com  $3 \text{ mg L}^{-1}$  PPT, onde permaneceram até o desenvolvimento das plântulas de milho, aproximadamente 2 semanas.

Em um total de 37 placas bombardeadas (925 calos), obteve-se 46 plantas possivelmente transgênicas após todo o processo de seleção dos calos. Estas plantas foram transferidas para casa de vegetação para obtenção de sementes (Figura 11), bem como análises moleculares. As análises realizadas nestas plantas confirmaram 98% de transgênia (45 plantas), resultando em

apenas 2% de escape. O que demonstra uma boa eficiência no processo de seleção. A frequência de transformação observado foi na ordem de 4,86% (45plantas / 925 calos bombardeados).

O'Connor-Sanchez et al. (2002), também utilizando transformação de milho via biobalística, observaram que, linhagens tropicais mantidas por 12 semanas em meio suplementado com PPT na concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup>, apresentaram 80% de calos positivos no teste histoquímico de GUS. Outros agentes seletores também são empregados na seleção. Przetakiewicz et al. (2004) descreveram que a utilização de canamicina na seleção de calos transgênicos de trigo gerou 46% de escapes, isto é, plantas não transgênicas capazes de crescer em presença do agente seletivo. Entretanto, estes mesmos autores utilizando no meio de seleção o PPT, obtiveram apenas 16% de escape. Estes dados mostram que o PPT é um agente seletivo eficiente para a produção de cereais transgênicos.

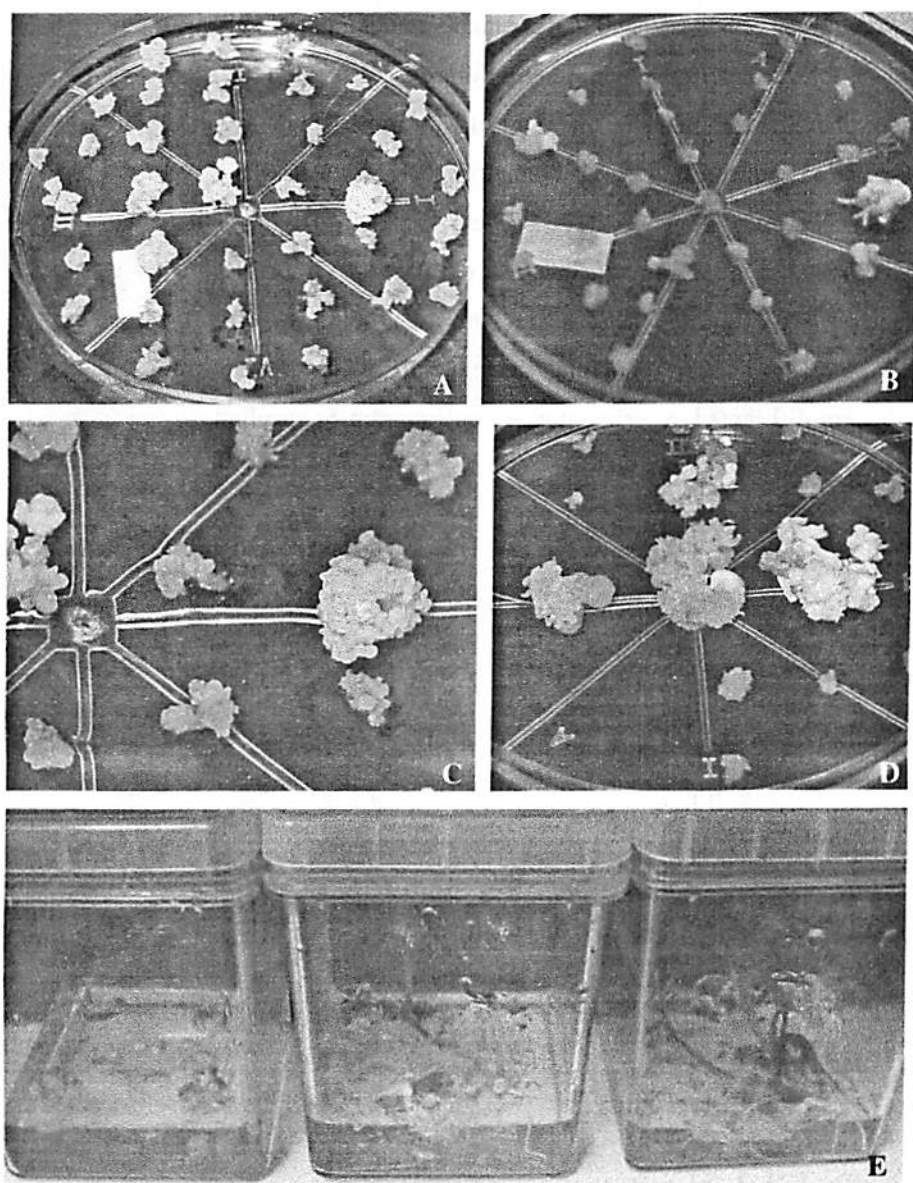


FIGURA 11: Processo de seleção de calos embriogênicos de milho transformados. A e C: calos em seleção cultivados em meio suplementado com 9PPT; B e D: calos em fase de maturação cultivados em meio RM suplementado com 6PPT; E: regeneração de plântulas de milho transgênicas em meio suplementado com 3PPT; da esquerda para a direita observa-se o estágio inicial da regeneração, início de formação da plântula e plântula já em fase de transferência para casa de vegetação.

### 4.3 Análises de plantas transgênicas

Para comprovar a transgenia das plantas selecionadas utilizou-se análises de PCR e *Southern Blot*. Inicialmente, foram realizadas reações de PCRs, utilizando primers A6 X A7, que amplificam uma região com 588pb do promotor AtPT2, conforme descrito na metodologia. Estas análises mostraram a presença da construção gênica AtPT2.GUS em 45 plantas (Figura 12).

Autores como O'Connor-Sanchez et al. (2002), Przetakiewicz et al. (2004), Delporte et al. (2001), Xu et al. (2005), Carneiro et al. (2005) também utilizaram reações de PCR para uma seleção inicial das plantas transgênicas produzidas em diferentes experimentos, e confirmaram os resultados através de análises de *Southern Blot*.

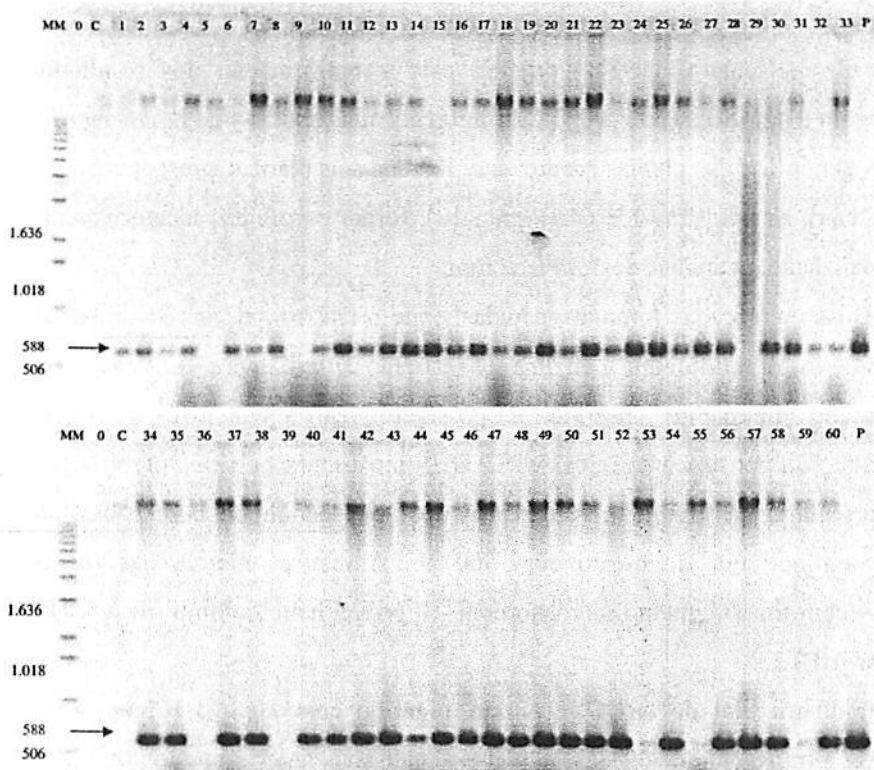


FIGURA 12: PCR de plantas transgênicas de milho contendo a construção AtPT2.GUS. PCR realizado com os Primers A6 X A7 amplificando uma banda de 588pb. MM: Marcador Molecular (1 Kb); 0: PCR branco; C: Controle negativo; P: Plasmídeo; Amostras 1 a 7 e 60: DNA de plantas transgênicas em cultura de tecidos; Amostras 8 a 59: DNA de plantas transgênicas em casa de vegetação. Gel de agarose 0.8%.

Análises de PCR não são aceitas como prova final de transgênia porque, devido a alta sensibilidade da técnica, podem gerar falsos positivos. Quantidades mínimas de DNA contaminante, contendo o gene analisado podem ser amplificadas (Romano, 1998). Portanto, para a confirmação dos resultados obtidos com a amplificação por PCR, foram realizadas análises de *Southern Blot* do DNA genômico das plantas produzidas. Trinta e seis plantas, presentes no gel de PCR entre as amostras 1 e 64 (Figura 12), foram escolhidas aleatoriamente para a realização da análise de *Southern Blot*.

Duas membranas foram preparadas, onde o DNA total, das 36 amostras escolhidas, foi digerido com a enzima de restrição *HindIII* para verificação do tamanho do fragmento inserido e possíveis rearranjos. O mapa esquemático da construção gênica AtPT2.GUS mostrando os sítios de restrição está apresentado na Figura 6. A digestão do DNA genômico com a enzima *HindIII* originou um fragmento com 500 pb. Ambas as membranas foram sondadas com um fragmento marcado com  $^{32}\text{P}$  proveniente da amplificação do promotor AtPT2.

Southern blot do DNA genômico, digerido com *HindIII* (Figura 13), confirmou a transgênia de 32 das 36 plantas analisadas anteriormente por PCR. Estes dados mostram que falsos positivos podem aparecer em amplificações do DNA genômico por PCR. Foram observados fragmentos na parte superior do gel oriundos da ligação da sonda com a sequência promotora. Uma vez que a sonda possuía 972 pb e o DNA foi clivado em 500pb. De acordo com Romano (1998) estes fragmentos, presentes na parte superior do gel podem ser sequências homólogas presentes nos DNAs genômicos de *A. thaliana* e do milho, ou apenas, “background”. Quando a sonda está muito concentrada, a cinética de hibridação é muito alta o que pode gerar resultados inespecíficos. O “background” pode ter acontecido nestas análises uma vez que se observa uma forte intensidade nas bandas superiores tanto de plantas transgênicas quanto de plantas não

transgênicas. Resultados como estes são descritos por Baldwin et al. (2001) que trabalharam com o gene LePS2 responsivo ao Pi em tomate. Estes pesquisadores clonaram este gene e transformaram *Escherichia coli*. Na verificação da transformação mediante a técnica do Southern blot, observaram além do fragmento de DNA do tamanho esperado no gel, a presença de outros fragmentos que diferiam do tamanho esperado. Eles justificam o aparecimento destes fragmentos pela presença de regiões homólogas entre o DNA da bactéria e do tomate.

O' Connor-Sanchez et al. (2002) trabalhando com a geração de plantas transgênicas de milho, também observaram, em adição ao tamanho de fragmentos esperados, outras bandas de tamanhos diferentes, presentes nos géis de Southern Blot. Estes autores justificaram os resultados observados como sendo rearranjos e / ou múltiplas inserções no genoma da planta gerada em locais onde houvesse sítios de clivagem da enzima utilizada. Esta justificativa parece ser a mais concisa para estes resultados, uma vez que uma das desvantagens da biobalística é normalmente a inserção de várias cópias do inserto no genoma da planta gerada. Além do mais, durante o processo de precipitação do DNA sobre as partículas este pode ser quebrado. Apesar disto o processo da biobalística tem-se mostrado efetivo desde a transformação de microrganismos até plantas e animais (Sanford et al., 1993). Uma das principais vantagens é a eficiência na transformação de Gymnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado na transformação por meio de *Agrobacterium* (Brasileiro e Carneiro, 1998). Estes dados mostram que no caso de transformação via biobalística rearranjos são facilmente observados no genoma do transgene.

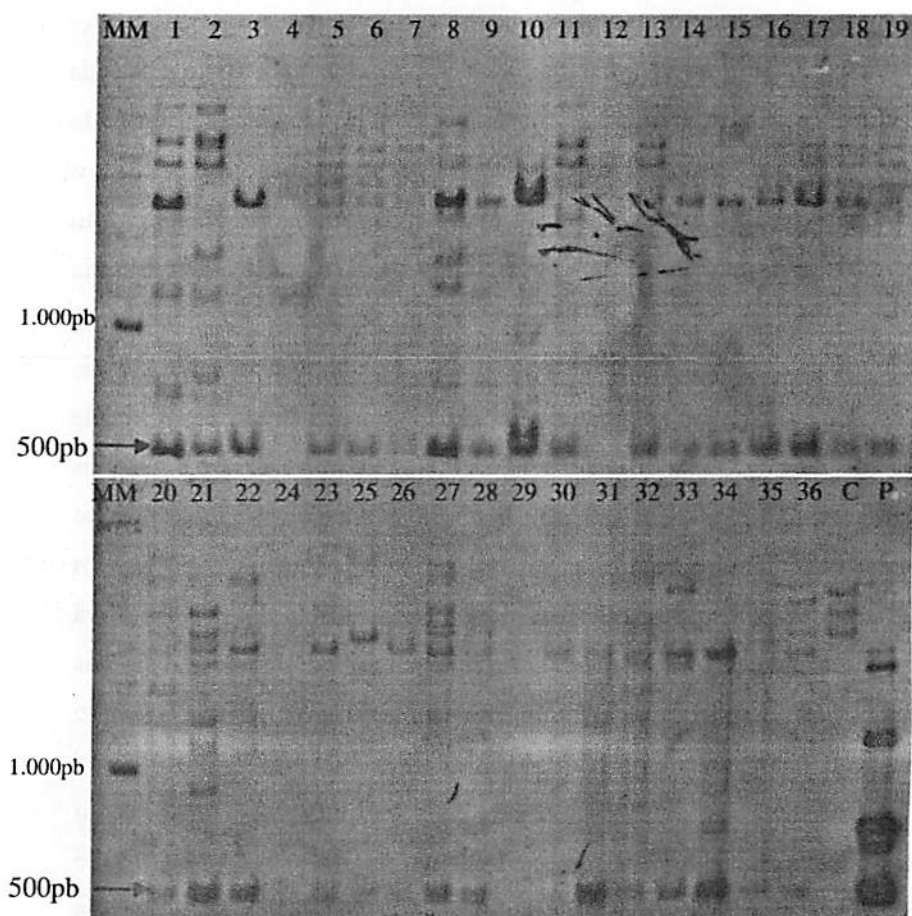


FIGURA 13: Southern blot de DNA de plantas transgênicas digeridos com as enzima HindIII – sonda AtPT2. Onde: amostras entre 1 a 36: representam plantas transgênicas positivas na PCR; C: controle negativo; P: plasmídeo; MM: marcador molecular, 1Kb; a seta indica o fragmento de 500 pares de bases, referente ao tamanho da sonda..

#### 4.4 Análises de seqüências do promotor

A identificação de fatores de transcrição, fatores de regulação e genes envolvidos na resposta gerada pela deficiência de Pi podem contribuir para o melhoramento das culturas. Muitas seqüências responsáveis pela ligação de proteínas que regulam a resposta, de diferentes organismos, ao estresse de



fósforo já foram descritas. Em um trabalho de revisão, Hammond et al. (2004), descrevem elementos *cis* que agem em resposta a deficiência Pi em diferentes promotores. O promotor AtPT2 foi analisado buscando localizar em sua seqüência homologia com estas seqüências utilizando o programa Genamics Expression. As seqüências homólogas às descritas por Hammond et al. (2004) encontradas no promotor AtPT2 estão apresentadas nas Figuras 14a e 14b. A presença destes elementos conservados em diferentes genes responsivos ao estresse de Pi, sugere que os mecanismos utilizados para lidar com este tipo de estresse, foram conservados entre diferentes organismos.

Dentre as seqüências encontradas no promotor AtPT2, o elemento PHO, responde rapidamente à deficiência de Pi. Este elemento está presente na família PHO responsável pela síntese de fitase sob deficiência Pi (Oshima et al., 1996), contém um domínio “helix-loop-helix” (bHLH). A presença de elementos semelhantes em AtPT2 mostram que este promotor possui seqüências conservadas responsivas a deficiência fosfórica.

A seqüência, Pi responsiva, ATGCCAT foi localizada á 102 pb da extremidade 5’ do promotor AtPT2; esta seqüência foi também observada por Mukatira et al. (2001) no promotor TPS11 de tomate.

O elemento TC (TCTCTCT) e o NIT 2 (AAATATCT) também foram localizados no promotor AtPT2.

Outros elementos responsivos ao Pi relacionados a famílias de proteínas MYB, fatores de transcrição, como PHR1 element (GNATATNC) aparecem como sítios de ligação destas proteínas (Rubio et al. 2001). Proteínas Helix-loop-helix, também fatores de transcrição que se ligam a seqüências (CA(T/G)(A/C)TG) estão presentes no promotor AtPT2.

A homologia entre estes diferentes elementos *cis* e o promotor AtPT2 indica a complexidade da regulação deste promotor, sugerindo que o promotor

AtPT2 pode ser regulado por diversos tipos de elementos *cis* e possui sítios para ligação de diferentes fatores de transcrição.

Um outro elemento responsável pela ligação de fatores de transcrição relacionados a outros tipos de estresse foi também localizado, o domínio WRKY.

As análises realizadas com o programa Genamics Expression indicaram a presença de mais de uma sequência TATA-box no promotor. Baseado na presença do domínio (TTGACA) de desenrolamento, identificada por Lewin (2001), presente antes da sequência TATA, determinou-se neste trabalho a sequência TATA-box responsável pelo início da transcrição (Figura 14a). Este domínio de desenrolamento auxilia a liberação da fita de DNA das histonas, permitindo a ligação da RNA polimerase e conseqüentemente a transcrição. Ainda, de acordo com Lewin (2001) um promotor eucariótico não funciona sozinho, ele requer reforçadores que agem auxiliando a regulação da expressão. Diversos elementos descritos por Hammond et al. (2004) são descritos e localizados no promotor AtPT2, neste trabalho. A presença de sequências TATA dentro deste promotor podem representar apenas sequências palindrômicas, não relacionadas com a regulação do gene AtPT2.

A figura 14a e b mostra a localização de diferentes elementos *cis* e sequência TATA-box no promotor AtPT2.

5' -----

CCCATTTCGTGAATGAAAACACTACGGTGTATATATGTGAAAGACATATATGGAGCCTTCACTATACGGTGTAGTTCATTACATAA  
GAATGGTTGGAAATGGAGATG **CAAAAT** TTTTTTTTTTCCACAATGGAGATG **CAAT** **TATAAA** AAAAGAAAAGAGGTTGAA  
CTAGTTGGGTCGGCCGACGAAAAGAGAAAATACAACCTTCTGGGCTAAATCTAGAAAATTCCTTTCTGTAAATGCCTTAAAT  
TAATGGCTCTTATTTATCAAATACGGAACAAACCCCTCTTACACCTTACAAGTTACGGGTATAGGGTGTATTATTCTCCCGTACC  
CGTTCAAACTACA **CAAT** **ATAAACCATTGACATTGTAGACCTATTACACATCCCTGCAGTTATTGGCTTATTGCGATCTTAT**  
TAAATCCAAAGATACATA **CAAT** **GAAGAAACAAAAGTCAAGAAATAATAAAACGAAAATAAATGAAGGCATCAATAAAGC**  
TTACCGCTCACATGTTTTTTCTAATAACTAATTTTTATTAAAAAGCAGTTTATACATCTACCAAATTTATTTCITAGCATA  
AATATATATTTGGGTT **CAAT** **TTAAGTCTTTCTGACTTCTGAGTGATAATCACCAGTTTGCAACTTATATTGGCTAAACC**  
GCATGCCAATTGTCATGTAICG **CAAT** **GTAATGGTATTAATGACGACGATCCCAAAATTTAAATTCCTTTCCAAGCATTGA**  
GCTCTTTAAACAATTCATGGTCAACTTAATTACAAGGAAAAAAGAAGTATTGTTATAGTGGAAACAGCTATTTTTTGGAT  
ATTAAAAGAATAATAACAGCAAAACAGAAATATCGTGTCTAATAATACCTAAGTCCCTAAACGAAGCAAAAAGTTGGTAAAT  
AAAGGAAGAAAAACCTACAAGATATAAAACGGTGTGTTGTCGGAAGAATATACCGAAGTAGCAAAAAGGAATATCTCATTAG  
AGAGTCCCT **TATAAA** **GACCGTTTTAATCACTTCAACTCTGTCTTGTTCATAGGCAGCTTCAACGATCATTCACCTCCTTC**  
TTCC **CTCTCT** CAACATTTCCCTGAAAAAAGGAACTAAGATTCTTCC **CTCTCT** TTCTACACTTCTGACAATACTAA  
AACACTTTATCAGATCAGATCCCACATAAACTTTCTGTAAGTGTTCCTTTAAACTATGCTTTTGATGTTAATGTTTATGGAT  
GCATAATGATTTTAGTTAGGACGTTAICGTTTTGTTTTGTTAGGTGGTCCCTCTCCCTGTTCAATCTCTAANTCGTCATGTC  
TTATTCGTTTTCTTATTGAAAAAACAACACTGAAACTAGTTTTGTTTTTCCAACCTTCTTGGATCATTAAATAGGATTGCT  
**CTCTCT** TCAAACGATTTTTGTTGGATCTCTCCTCTCAGTCTAGAAGACTTTTTTTTTTCTTTTGTGAGTGATGATTT  
CAAAAAATTC AATTGAAGAAGTTTGATATTTTGTGTTTTCTTCTTCAATAAGAGGTGTGCCCAATTAAGACAAAAACA  
ACTCGCTGTCATACTCTCAGTTAAAGTCTTTGTG **CTCGTG** TCCAGATTTCACTAGACGTCACAAGTCAACTTTTGTGGGTAA  
CCGAAGACAAATAGTAATCGTTGAAAACACTACAATAATAAAATAAGTACTTCCAGTGTCTCCGTTCACTTTAAAAAGTCGAAAT  
AAACCAAAAAAATAGGAATAACAATCTTTTGTATATCCGTTAACAATCTTTTACAATTAATAAGAAGAACGTATATAATA  
AATATTTCAAATTA **CGAGT** TGGACTAATTAATATTGGAGTCGACTTTTATTATCACTTCATTTCACTTCTTATTTGAA  
TATGCATATATATGGTTCTCTTGCAATAAGTAATCATATA **TATAT** TACAGGAACATGAAAAGTTGTCGTTAACAACATTT  
CATCTAAAAACATACATATGTTATTTTCTAATATTGCCTAAATCAAGTTCGGTGAACATACTTTATTGGGTTGTAATTGTG  
AGATCAATGAAATGAGAAAAATTAATAGAAGTCTTTATGATATTTAATGTTAA **CAAA** **TATAAA** GCAGGGTCTAATTCI  
ATTTGCTTTTGAACCTGCCTAACITATTTCAAGTTCGGTATAACTACTCTTTATTGTTGTAATGAGTTATTTAAGGGTACI  
TATATGTCGAACTTTTTTTTGTGTATGAAAATTCAGAGGAGAAGAAGA

3'

FIGURA 14a: Localização de elementos responsivos a deficiência de Pi na sequência do promotor AtPT2. Análises realizadas pelo software Genamics Expression. Entre os nomes dos elementos estão as sequencias homologas encontradas no promotor. Os elementos estão marcados com diferentes cores conforme descrito: P responsive; **NR1 element**; **N1W-2**; **TATA box like**; **RR**; PHO-like; **helix-loop-helix**; TC element. O **Domínio de desenrolamento** está marcado próximo ao TATA-box



## 4.5 Análise da expressão do cassete AtPT2.GUS em plantas transgênicas

### 4.5.1 - Análise histoquímica e fluorométrica

Para avaliar a expressão da enzima  $\beta$ -glucuronidase, controlada pelo promotor AtPT2 em plantas transgênicas de milho, sementes T1 provenientes dos eventos transgênicos obtidos foram germinadas e submetidas ao estresse de fósforo. Segundo Muchhal et al. (1996), o gene AtPT2 é ativado em *A. thaliana* após cinco dias na ausência de fósforo inorgânico. A expressão de GUS foi estudada através de análise histoquímica e fluorimétrica.

De acordo com os dados apresentados por Karthiketyan et al.(2002), em plantas de tabaco e *Arabidopsis thaliana* transformadas com este mesmo promotor, direcionando a síntese de três genes repórteres diferentes: Green Fluorescent Protein (GFP),  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) e Luciferase, a expressão dos genes repórteres foi detectada apenas em plantas submetidas ao estresse de fósforo e, preferencialmente nas raízes. Os resultados das análises histoquímicas obtidos neste trabalho, confirmam parcialmente os resultados apresentados por Karthiketyan et al. (2002). A expressão do gene GUS direcionada pelo promotor AtPT2, em plantas transgênicas de milho, foi detectada apenas quando as plantas foram submetidas ao estresse de fósforo (Figuras 15a – 15c). Este dado sugere que *A. thaliana* e *Zea mays* compartilham mecanismos regulatórios comuns para a ativação de genes envolvidos na resposta a este tipo de estresse. Entretanto, em contraste com os resultados obtidos por Karthiketyan et al.(2002), a expressão da  $\beta$ -glucuronidase não ficou restrita às raízes. Expressão do gene repórter GUS foi observada também nos feixes vasculares das folhas de milho transgênico. Estes resultados sugerem que os domínios relacionados com o direcionamento da expressão do gene AtPT2 preferencialmente em raízes parecem não serem conservados entre *A. thaliana* e o milho. Uma vez que estes 2,3 kb de seqüências

5' não codante do gene AtPT2, utilizados para direcionar a expressão do gene GUS em milho, foram os mesmos utilizados para transformar *A. thaliana* e tabaco, podemos concluir que todas as seqüências CARE, necessárias para o direcionamento da expressão gênica na raiz estavam presentes. Possivelmente, os fatores de transcrição e as seqüências CAREs responsáveis pela expressão raiz específica de genes em milho não são conservados em arábido.

A expressão do cassete AtPT2.GUS em folhas de milho transgênico foi detectada apenas no sistema vascular, embora isto não tenha sido detectado em *A. thaliana* transformada com este mesmo cassete gênico. Alguns autores, trabalhando com diferentes genes regulados pelo estresse de fósforo, mostraram sua expressão, também, na parte aérea das plantas transgênicas. Misson et al (2004), demonstraram a atividade de GUS direcionada pelo promotor Pht 1;4, em meristemas apicais e tricomas de plantas transgênicas de *A. thaliana*, em meio com baixo suprimento de fósforo. Mudge et al (2003), demonstraram que o promotor Pht1;2 tem expressão preferencial em raízes, mas também pode ser expresso em tecidos dos canais dos hidatódios, epidermes e regiões meristemáticas como brotos em baixos níveis de fosfato. Schünmann et al (2004), visualizaram a expressão de genes repórteres direcionados pelo promotor Pht1 (transportador de fosfato) preferencialmente em raízes, mas também em folhas de arroz em baixa disponibilidade de fosfato. A atividade da  $\beta$ -glucoronidase em hidatódios foi também observada por Misson et al (2004), em *A. thaliana* transgênicas, onde a expressão do gene repórter estava sendo direcionada por promotor Pht1;4 especificamente ativo em deficiência Pi.

A diferença na especificidade da indução do gene repórter GUS, entre arábido e milho, pelo promotor AtPT2, parece estar relacionada com a heterogeneidade dos sistemas de mono e dicotiledôneas, uma vez que Karthiketyan et al. (2002), não observaram diferença na expressão de genes repórteres, direcionados por este mesmo promotor, entre *A. thaliana* e tabaco,

ambas plantas dicotiledôneas. Existem muitas diferenças anatômicas e fisiológicas entre estes dois sistemas e o controle da expressão gênica pode estar relacionado com estas diferenças, já que se trata de um promotor tecido específico de dicotiledônea sendo estudado em uma monocotiledônea.

Peterhans et al. (1990), afirmaram que não são transcritos freqüentemente genes de monocotiledôneas em dicotiledôneas, ou quando é observada a produção de pré-mRNA, este se apresenta ineficiente ou aberrantemente processado. Não se conhece, corretamente, como são reconhecidos sinais de expressão de genes de dicotiledôneas em monocotiledôneas.

Em raízes observam-se também diferenças anatômicas e fisiologias entre plantas mono e dicotiledôneas, a ausência de raiz principal e a formação de raízes laterais são algumas delas. A formação de aerênquima em *A. thaliana* mantidas sob deficiência de Pi não foi observada por Misson et al. (2004), no entanto, estas formações foram observadas em milho crescidos sob estresse de Pi (Figura 15c). O primeiro sinal de iniciação de aerênquima, em raízes de milho sob deficiência de Pi, foi observado em um grupo de células no córtex mediano com perda de turgor. A formação aumentou radialmente em células circunvizinhas. Acredita-se que a formação de aerênquima sob baixa disponibilidade de Pi pode ser uma adaptação útil, contribuindo para reduzir os custos metabólicos, uma vez que o transporte através das membranas requer gastos energéticos; além da planta remobilizar os fosfolípidios presentes nas membranas celulares degradadas.

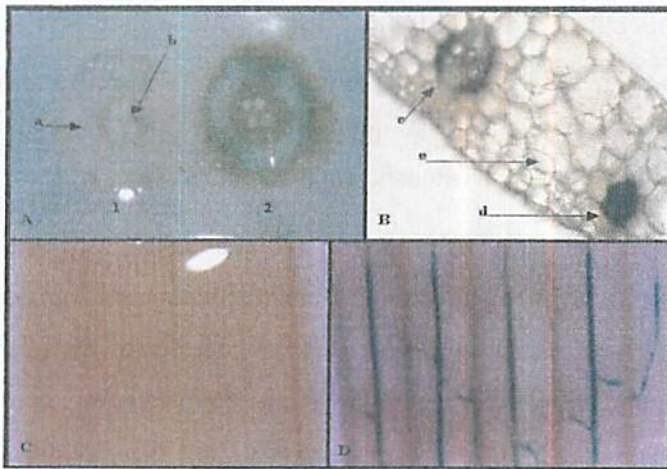


FIGURA 15a: Expressão do Gene Repórter GUS em Plantas Transgênicas de Milho Contendo a Construção AtPT2.GUS. (A) Raiz de Milho: 1) Após 5 dias em solução nutritiva completa; 2) Após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo; (B) Corte transversal de uma folha de milho após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo; (C) Folha de milho após 5 dias em solução nutritiva completa; (D) Folha de milho após 5 dias em solução nutritiva sem fósforo. (a) córtex; (b) cilindro vascular; (c,d) feixe vascular; (e) mesófilo foliar.

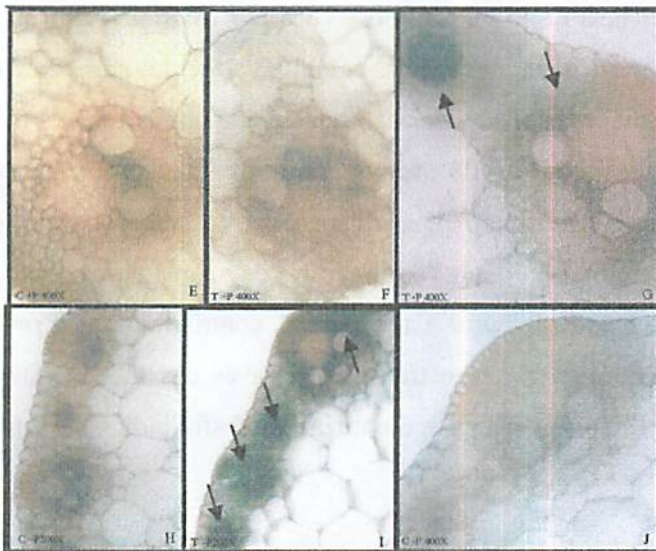


FIGURA 15b: Fotomicrografias de folhas analisadas em teste histoquímico. Onde T, planta transgênica e C, planta controle. E: Controle não transgênico mantido em solução nutritiva suprida com fosfato; F: Planta transgênica suprida com fosfato; G e I: Planta transgênica mantida em solução nutritiva sem fosfato; H e J: Controle mantido em solução nutritiva incompleta. As setas mostram a região de expressão do GUS



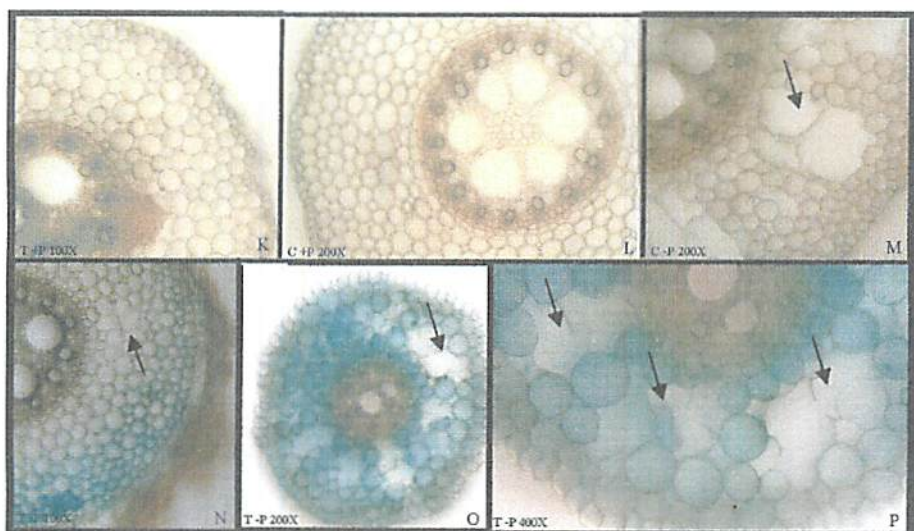


FIGURA 15c: Fotomicrografias de raízes analisadas em teste histoquímico. K: Planta transgênica mantido em solução nutritiva suprida com fosfato, observa-se o início de formação de raiz lateral ; L: Controle não transgênico suprida com fosfato; M: Controle mantido em solução nutritiva sem fosfato; N, O e P: Planta transgênica mantida em solução nutritiva incompleta. Nota-se em M, N, O e P a formação de aerênquimas nas raízes. Observa-se em N a presença de mucilagem ao redor da raiz. Setas destacam os aerênquimas.

Buscando quantificar a expressão da enzima  $\beta$ -glucoronidase foram realizadas análises fluorimétricas nas raízes e partes aéreas das plantas transgênicas produzidas. Estas análises demonstraram que a maior atividade específica da enzima foi detectada nas raízes de plantas mantidas em solução nutritiva incompleta, onde não foi adicionado o Pi. A expressão média da enzima sob inanição de Pi foi  $94 \mu\text{mol} / \mu\text{g} \text{ proteína} / \text{minuto}$  nas raízes das plantas transgênicas. Atividade específica de GUS foi também detectada em folhas de plantas sob o estresse de Pi na faixa de  $16 \mu\text{mol} / \mu\text{g} \text{ proteína} / \text{minuto}$ . Uma atividade específica basal de GUS da ordem de  $33 \mu\text{mol} / \mu\text{g} \text{ proteína} / \text{minuto}$  para as raízes e  $4,8 \mu\text{mol} / \mu\text{g} \text{ proteína} / \text{minuto}$  para as folhas foi

detectada em folhas e raízes de plantas transgênicas supridas com Pi. (Figura 16a e b).

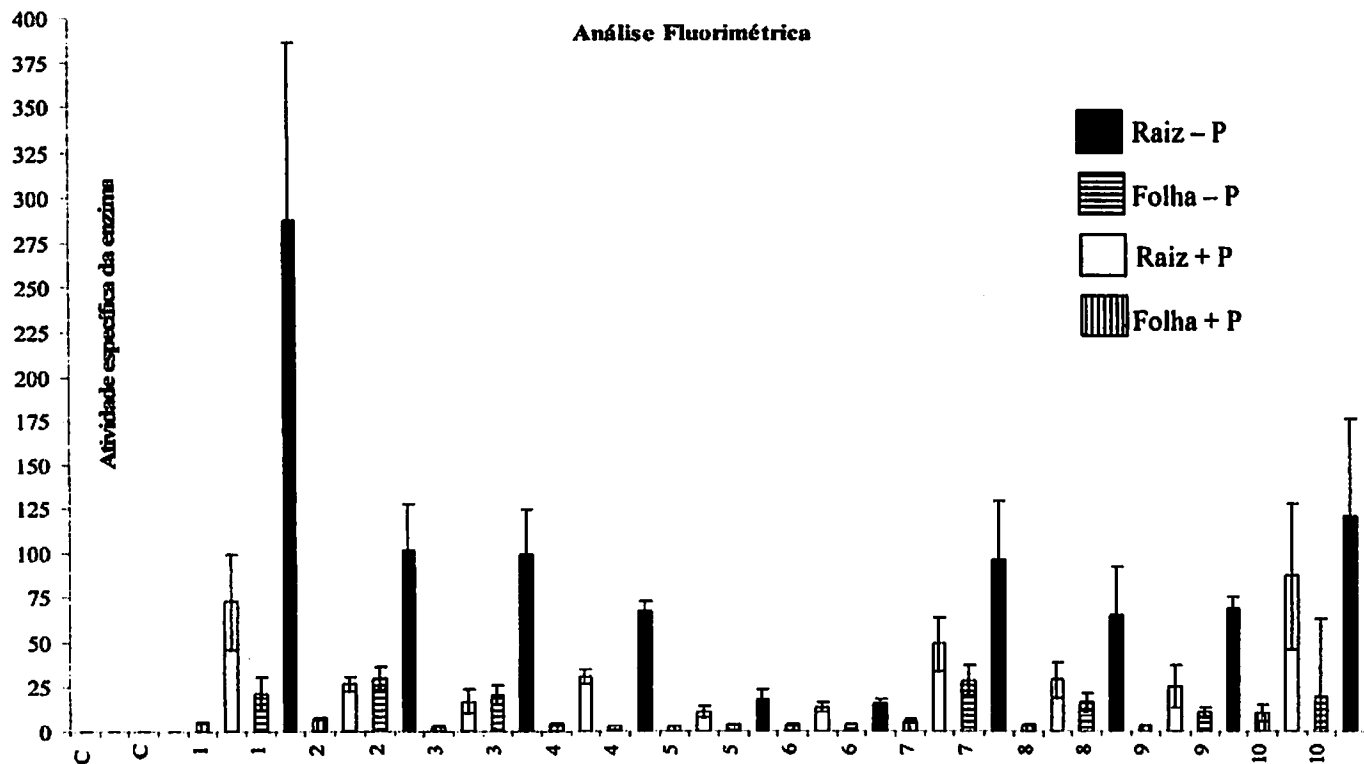


FIGURA 16a: Atividade específica da enzima  $\beta$ -Glucuronidase. Eixo Y: Atividade da enzima quantificada a partir da absorbância em 595 nanômetros; eixo X plantas analisada, C.F.: Controle Folha; C.R.: Controle Raiz; +P: Plantas mantidas em solução nutritiva suplementada com fósforo; -P Plantas mantidas em solução nutritiva sem fósforo; 1 a 10 amostras transgênicas.



Figura 16b: Média da Atividade específica da enzima em pmol/µg proteína/minuto. C controle; F folha; R raiz. +P: plantas mantidas em suprimento de P; -P: plantas sob estresse fosfórico.

Estas análises demonstraram que o AtPT2 é um promotor ativo, em plantas de milho transgênicas, de forma mais expressivas em deficiência fosfórica. Apesar do gene GUS apresentar uma expressividade baixíssima em presença de Pi, esta torna-se ínfima quando comparada à situação de deficiência. Estes resultados confirmam a presença de elementos acentuadores da transcrição, já mencionados no item 4.5 deste trabalho, neste promotor, os quais agem intensificando sua expressão em situação de deficiência fosfórica. O nível basal de atividade de GUS encontrado nas plantas transgênicas, sem o estresse de Pi, pode ser causado por fatores de transcrição que se ligam à seqüências ativadores da transcrição, comuns entre diferentes promotores. Resultados encontrados por Varadarajan et al (2002) em *A. thaliana* transformadas com AtPT2-LUC mostram que este promotor é capaz de direcionar uma baixa expressão deste gene repórter em solução nutritiva completa quando estas plantas passaram anteriormente por estresse. Misson et al (2005) também mostraram uma

expressão basal do gene repórter GPF (*Green Fluorescence Protein*) fundido ao promotor AtS6K2 ribossomal, ativado em deficiência fosfórica.

#### 4.5.2 - RT-PCR

Na tentativa de validar os resultados observados, da expressão de GUS em folhas e raízes das plantas transgênicas de milho, foi realizada análises de RT-PCR. Neste experimento o material analisado é o RNA. Após a extração do RNA (Figura 17) é produzida uma fita de DNA através da Transcriptase Reversa originando o cDNA ou DNA complementar, a partir desta fita simples de DNA faz-se uma PCR com primers específicos para a enzima  $\beta$ -glucuronidase, comprovando assim sua expressão no tecido estudado. Os resultados apresentados na Figura 18 confirmam os dados obtidos nas análises fluorométricas e histoquímicas; existe realmente atividade da  $\beta$ -glucuronidase em folhas e raízes das plantas de milho transgênicas. Os resultados das análises de RT-PCR mostram que o promotor AtPT2 é capaz de direcionar a expressão de GUS tanto em folhas como raízes de milho, quando a planta está sob o estresse de Pi. Entretanto, uma maior concentração do mRNA que codifica para a  $\beta$ -glucuronidase foi detectada em raízes em inanição de Pi

Karthikeyan et al (2002) também observaram a expressão do gene GUS direcionado pelo promotor AtPT2 em flores e frutos de *A. thaliana* transgênicas, com 1 mês de vida, e cultivadas por 2 semanas em solução nutritiva com deficiência fosfórica.

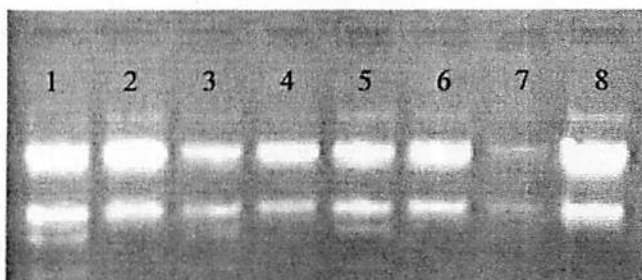


FIGURA 17: Gel de RNA total. Amostras: 1 e 2: Plantas transgênicas, folha e raiz sob estresse de P; 3 e 4: Plantas transgênicas supridas de P; 5 e 6: Plantas controle, não transgênicas em inanição de P; 7 e 8: Plantas controle não transgênicas supridas de P.

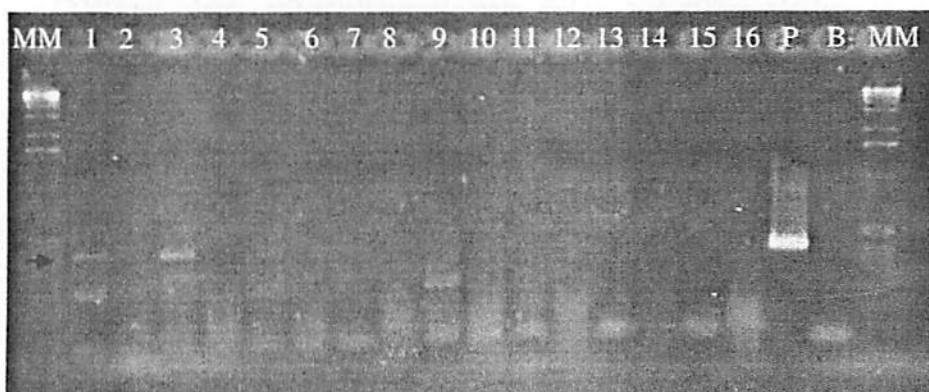


FIGURA 18: Gel de RT-PCR. 1 e 3: cDNA das amostra 10-P F e 10 - P R respectivamente; 2e 4 RNA total idem à 1 e 3; 5 e 7 cDNA das amostras 10+P F e 10+ P R respectivamente; 6 e 8 RNA total idem à 5 e 7; 9 e 11: cDNA das amostras do controle folha e raiz em-P respectivamente; 10 e 12: RNA total idem à 9 e 11; 13 e 15: cDNA das amostras do controle folha e raiz em +P respectivamente; 14 e 16: RNA total idem à 13 e 15; P: DNA plasmidial; B: branco; MM: marcado molecular.

## 5 CONCLUSÕES

O promotor AtPT2, transportador de fosfato 2, isolado de *Arabidopsis thaliana* direciona expressão diferencial em milho, uma planta monocotiledônea.

- A especificidade de expressão de genes, controlada pelo promotor AtPT2, nas raízes de plantas sob estresse de Pi, foi parcialmente perdida entre os sistemas dicotiledônea e monocotiledônea. O promotor AtPT2 em plantas dicotiledôneas, como arábido e tabaco, direciona a expressão de genes especificamente nas raízes sob o estresse de Pi, enquanto que em plantas transgênicas de milho, carregando a construção AtPT2.GUS, a expressão do gene repórter foi detectada tanto nas raízes como em folhas. O nível de expressão em folhas foi menor do que nas raízes transgênicas de milho.
- Existem regiões conservadas entre o promotor AtPT2 e elementos responsíveis ao Pi presentes em diferentes promotores isolados de diferentes organismos.
- Sob deficiência fosfórica as raízes de milho podem formar aerênquima e isto parece ser um mecanismo usado pela planta para suprir a necessidade de Pi.

Estes resultados indicam que o promotor AtPT2 poderá ser utilizado para direcionar a expressão de genes, em milho, que possam otimizar a absorção de fosfato, como por exemplo, os ácidos orgânicos, tornando a planta mais tolerante ao estresse de Pi e, propiciando assim plantas mais adaptada às condições do Cerrado brasileiro. Entretanto, pesquisas em direção ao isolamento de um promotor raiz específico em milho, responsivo ao estresse de Pi, continuam sendo necessárias, uma vez que a expressão direcionada de genes na raiz, contribuirá para uma economia de energia da planta. Esta economia poderá, possivelmente ser revertida para uma maior produção de grãos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S.; TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A. Phosphate sensing in higher plants *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 115, n. 1, p. 1-8, May 2002.

ALMEIDA, R. S. **Identificação e Caracterização de genes Transportadores de Fósforo em Cana-de-açúcar.** 2002. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

ANUÁRIO BRASILEIRO DO MILHO 2004. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2004. 136 p.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and Maintenance of Friable, Embryogenic Maize Callus and the Involvement of L-proline. *Planta*, New York, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.

BALDWIN, J. C.; KARTHIKEYAN, A. S.; RAGHOTHAMA, K. G. LEPS2, a Phosphorus Starvation-Induced Novel Acid Phosphatase from Tomato. *Plant Physiology*, Rockville, v. 125, n. 2, p. 728-737, Feb. 2001.

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgenic Cereal (triordeum) Plants Obtained at High Efficiency by Microprojectile Bombardment of Inflorescence Tissue. *Plant Journal*, Oxford, v. 5, n. 4, p. 583-592, Apr. 1994.

BASSETT, C. L.; NICKERSON, M. L.; FARRELL JR, R. E.; HARRISON, M. Multiple transcripts of a gene for a leucine-rich repeat receptor kinase from morning glory (*Ipomoea nil*) originate from different TATA boxes in a tissue-specific manner. *Molecular Genetics and Genomics*, New York, v. 271, n. 6, p. 752-760, July 2004.

BATTY, N. P.; EVANS, J. M. Biological Ballistics - no Lnger a Shot in the Dark. *Transgenic Research*, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 107-113, 1992.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H. Fertile Transgenic Wheat From Microprojectile Bombardment of Scutellar Tissue. *Plant Journal*, Oxford, v. 5, n. 2, p. 299-307, Feb. 1994.

BECKER, D.; KEMPER, E.; SHELL, J.; MASTERSON, R - 1 New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA



border. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, n. 6, p. 1195-1197, Dec. 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, R. L.; CARNEIRO, A. A.; SCHARFFERT, R. E.; PAIVA, L. V. CARNEIRO, N. P. **Transformação genética do sorgo**. Embrapa Milho e Sorgo. 2005. No prelo.

BRASILEIRO E VERA T. C. CARNEIRO. **“Manual de Transformação de Plantas”**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998.

BRONSEMA, F. B. F.; VAN OOSTVEEN, W. J. F.; VAN AMMEREN, A. A. M. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, n. 1, p. 45-56, 2001.

BUCHER, M.; RAUSCH, C.; DARAM, P. Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 209-217, Apr. 2001.

BYTEBIER, B.; DEBOECK F.; DEGREVE, H.; VAN MONTAGU, M.; HERNALSTEENS, J-P. T-DNA Organization in Tumor Cultures and Transgenic Plants of The Monocotyledon *Asparagus officinalis* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 15, p. 5345-5349, Aug. 1987.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Transferência direta de genes para plantas. In: \_\_\_\_\_. **Transformação genética de plantas**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2003. p. 104.

CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. **Transformação genética de milho utilizando o bombardeamento de partículas**. Embrapa Milho e Sorgo, 2004. 32, 44 p.

CARVALHO, C. H. S. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. 1992-1993**. Sete Lagoas, MG: CNPMS/EMBRAPA, 1994.

CASAS, A. M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTTLER, L. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Transgenic Sorghum Plants Via Microprojectile Bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 90, n. 23, p. 11212-11216, Dec. 1993.

CHEN, W.; PROVART, N. J.; GLAZEBROOK, J.; KATAGIRI, F.; CHANG, H. S.; EULGEM, T.; MAUCH, F.; LUAN, S.; ZOU, G.; WHITHAM, S. A. Expression profile matrix of arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, Dordrecht, v. 14, p. 559-574, 2002.

CHRISTOU-P C. S. Strategies for Variety-Independent Genetic Transformation of Important Cereals, Legumes and Woody Species Utilizing Particle Bombardment. *Euphytica*, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 13-27, 1995.

CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU C. Y.; BI F. Y. Establishment of an Efficient Medium For Anther Culture of Rice Through Comparaative Experiments on The Nitrogen Sources. *Scientia Sinica*, Beijing, v. 18, p. 659-668, 1975.

COELHO, G. T. C. P.; RESENDE, R. K. S.; TORGA, P. P.; PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, A. A.; CARNEIRO, N. P.; PINHO, R. G. V.; PAIVA, R.; PAIVA, L. V. Embriogênese Somática de Linhagens Tropicais de Milho (*Zea Mays*) em Diferentes Concentrações de 2,4D. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 23, p. 600, 2005.

DAISH, T. J.; CAKOUROS, D.; KUMAR, S. Distinct promoter regions regulate spatial and temporal expression of the *Drosophila* caspase *dronc*. *Cell Death and Differentiation*, London, v. 10, n. 12, p. 1348-1356, Dec. 2003.

DARAM, P.; BRUNNER, S.; PERSON, B. L.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Functional Analysis and Cell-Specific Expression of a Phosphate Transporter from Tomato. *Planta*, New York, v. 206, p. 225-233, 1998.

DARAM, P.; BRUNNER, S.; RAUSCH, C.; STEINER, C.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. *Ph2;1* Encodes a Low-Affinity Phosphate Transporter from Arabidopsis. *The Plant Cell*, Rockville, v. 11, n. 11, p. 2153-2166, Nov. 1999.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. Update on Environmental Stress: Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology*, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; RANDALL P. J. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 3, p. 695-702, Nov. 1993.

DELPORTE, F.; JEROUVILLE, B.; MELARD, A.; KUTTEN, L.; BALEUX, R.; IULIANO, M.; SCHELLINGEN, D.; JACQUEMIN, J. M. Wheat transformation with glutenin gene. **Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet.** v. 66, n. 3b, p. 443-446, 2001.

DEROLES, S. C.; GARDNER, R. C. Analysis of the T-DNA Structure in a Large Number of Transgenic Petunias Generated by *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 11, n. 3, p. 365-377, 1988.

DUFF, S. M. G.; SARATH, G.; PLAXTON, W, C. . The Role of Acid Phosphatases in Plant Phosphorus Metabolism. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v 90, n. 4, p. 791-800, Apr. 1994.

DUNCAN, D. R.; WILLIAMS, M. E.; ZEHR, B. E.; WIDHOLM, J. M. The Production of Callus Capable of Plant Regeneration from Immature Embryos of Numerous *Zea mays* genotypes. **Planta**, New York, v. 165, n. 3, p. 322-332, 1985.

FAN, M.; ZHU, J.; RICHARDAS, C.; BROW, K. M.; LYNCH, J. P. Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots. **Functional Plant Physiology**, 30, 1-14, 2003). Authors' Page Proofs: Not For Circulation.

FROMM, M. E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, A.; 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. 833-839, Sept. 1990.

FUENTE, J. M.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. **Science**, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

FURTINI NETO, A. E.; VALE, F. R.; RESENDE, A. V.; GUILHERME, L. R. G.; GUEDES, G. A. A. **Fertilidade do solo**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 239 p.

GEORGE, T. S.; SIMPSON, R. J.; HADOBAS, P. A.; RICHARDSON, A. E. Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus

nutrition of plants grown in amended soils. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 129-140, Jan. 2005.

GOMES, F. T.; PEREIRA, G. D.; BORGES, A. C.; MOSQUIM, P. R.; FONTES, P. C. R. Metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob Supressão e ressuprimento de fósforo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 342-353, 2001.

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

GRAVES, A. C.; GOLDMAN, S. L. *Agrobacterium tumefaciens* -Mediated Transformation of the Monocot Genus *Gladiolus*: Detection of the Expression of T-DNA-Encoded Genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 4, p. 1745-1746, Apr. 1987.

GÜSWELL, S. N : P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. **New Phytologist**, Oxford, v. 164, p. 243-266, 2004.

HAHNEN, S.; JOERIS, T.; KREUZALER, F.; PETERHANSEL, C. Quantification of photosynthetic gene expression in maize C(3) and C(4) tissues by real-time PCR. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 75, n. 2, p. 183-92, 2003.

HAMMOND, J. P.; BENNETT, M. J.; BOWEN, H. C.; BROADLEY, M. R.; EASTWOOD, D. C.; MAY, S. T.; RAHN, C.; SWARUP, R.; WOOLAWAY, K. E.; WHITE, P. J. Changes in gene expression in arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 578-596, June 2003.

HAMMOND, J. P.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. **Annals of Botany**, Oxford, v. 94, n. 3, p. 323-332, Sept. 2004.

HIDALGO, E.; DEMPLE, B. Spacing of promoter elements regulates the basal expression of the *soxS* gene and converts SoxR from a transcriptional activator into a repressor. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1056-1065, Mar. 1997.

HINSINGER P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*, Dordrecht, v. 237, n. 2, p. 173-195, Dec. 2001.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. . High-frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). *Plant Cell Reportes*, New York, v. 22, p. 793-800, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 12 dez. 2005.

ISHIDA, V.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEL, 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.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAUGH, T. A.; BEVAN, M. W. Gus fusions: Beta-glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants. *EMBO Journal*, Oxford, v. 6, n. 13, p. 3001-3907, Dec. 1987.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 205, n. 1, p. 25-44, Aug. 1998.

KARTHIKETYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; MUKATIRA, U. T.; D'USZO, M. P.; DAMZ, B.; RAGHOTAMA, K. G. Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters1. *Plant Physiology*, Rockville, v. 130, n. 1, p 221-233, Sept. 2002.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANDFORD, J. C. High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic Acids Into Living Cells. *Nature*, London, v. 6117, n. 6117, p. 70-73, May 1987.

KOCHIAN, L. V. Cellular Mechanisms of Aluminum Resistance In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, A. A. How do Crop Plants Tolerance Acid Soils? Mechanisms of Aluminium Tolerance and Phosphorous Efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 55 p. 459-93, 2004.

LARSEN, P. B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.; STENZLER, L. M.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum-Resistant Arabidopsis Mutants That Exhibit Altered Patterns of Aluminum Accumulation and Organic Acid Release from Roots. *Plant Physiology*, Rockville, v. 117, n. 1, p. 9-18, May 1998.

LEGGEWIE, G.; WILLMITZER, L.; RIESMEIER, J. W. Two cDNAs from Potato Are Able to Complement a Phosphate Uptake-Deficient Yeast Mutant: Identification of Phosphate Transporters from Higher Plants. *Plant Cell*, v. 9, n. 3, p. 381-392, Mar. 1997.

LENTON, T. M. The role of land plants, phosphorus weathering and are in the rise and regulation of atmospheric oxygen. *Global Change Biology*, Oxford, v. 7, n. 6, p. 613-629, Aug. 2001.

LEWIN, B. *Genes VII*. Porto Alegre: Artmed, 2001. 955 p.

LI, Y.; ZHU, R.; XU, R. Activation of the gene promoter of barley  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzyme GIII is salicylic acid (SA)-dependent in transgenic rice plants. *Journal of Plant Research*, v. 118, p. 215-221, 2005.

LIGABA, A.; SHEN, H.; SHIBATA, K.; YAMAMOTO, Y.; TANAKAMARU, S.; MATSUMOTO, H. The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 120, n. 4, p. 575-584, Apr. 2004.

LIU, C. M.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M. KONONOWICZ, A. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Tomato Phosphate Transporter Genes Are Differentially Regulated in Plant Tissues by Phosphorus. *Plant Physiology*, Rockville, v. 116, n. 1, p. 91-99, Jan. 1998.

LIU, H. TRIEU, A. T.; BLAYLOCK, L. A.; HARRISON, M. J. Cloning and Characterization of Two Phosphate Transporters from *Medicago truncatula* Roots: Regulation in Response to Phosphate and to Colonization by Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v. 116, n. 1, p. 14-22, Jan. 1998.

LIU, J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Root-specific expression of a western white pine PR10 gene is mediated by different promoter regions in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 52, p. 103-120, 2003.

LIU, J.; SAMAC, D. A.; BUCCIARELLI, B.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P. Signaling of phosphorus deficiency-induced gene expression in white lupin requires sugar and phloem transport. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 257-268, 2005.

LIU, J.; UHDE-STONE, C.; LI, A.; VANCE, C.; ALLAN, D. A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). **Plant and Soil**, Dodrecht, v. 237, p. 257-266, 2001.

LOEB, T. A.; REYNOLDS, T. L. Transient Expression of the Uida Gene in Pollen Embryoids of Wheat Following Microprojectile Bombardment. **Plant Science**, Clare, v. 104, n. 1, p. 81-91, 1994.

LOPES, M. J. C. **Estresse oxidativo e análise anatômica em plantas de diferentes ciclos de seleção do milho 'Saracura BRS-4154' sob encharcamento contínuo**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LOPÉZ-BUCIO, J.; NEITO-JACOBO, M. F.; RAMÍREZ-RODRÍGUES, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic Acid Metabolism in Plants: From Adaptive Physiology to Transgenic Varieties for Cultivation in Extreme Soils. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 1, p. 1-13, Dec. 2000.

MAGNAVACA, R. **Genetic Variability and the Inheritance of Aluminum Tolerance in Maize (*Zea mays* L.)**. 1982. 135 p. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético de Plantas) - University of Nebraska, Nebraska.

MARTÍN, A. C.; DEL POZO, J. C.; IGLESIAS, J.; RUBIO, V.; SOLANO, R.; DE LA PENÁ, A.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Oxford, v. 24, n. 5, p. 559-567, Dec. 2000.

MARTON, L.; WULLEMS, G. J.; MOLENDIJK, L.; SCHILPEROORT, R. H. "In Vitro Transformation of Cultured Cells from *Nicotiana Tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*" **Nature**, London, v. 277, n. 5692, p. 129-131, 1979.

McCAIN, J. W.; HODGES, T. K. Anatomy of Somatic Embryos from Maize Embryo Cultures. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 147, n. 4, p. 453-460, Dec. 1986.

MILLER, S. S.; LIU, J.; ALLAN, D. L.; MENZHUBER, C. J.; FEDOROVA, M.; VANCE, C. P. Molecular control of acid phosphatase secretion into the

rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed *White Lupin*. *Plant Physiology*, v. 127, p. 594 – 606. October 2001.

MISSEON, J.; RAGHOTHAMA, K. G.; JAIN, A.; JOUHET, J.; BLOCK, M. A.; BLIGNY, R.; ORTET, P.; CREFF, A.; SOMERVILLE, S.; ROLLAND, N.; DOUMAS, P.; NACRY, P.; HERRERA-ESTRELLA, L.; NUSSAUME, L.; THIBAUD, M. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 102, n. 33, p. 11934-11939, Aug. 2005.

MISSEON J.; THIBAUD, M.; BECHTOLD, N.; RAGHOTHAMA, K.; NUSSAUME, L. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis Pht1;4*, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Molecular Biology*, Dodrecht, v. 55, n. 5, p. 727-741, July 2004.

MUCHHAL, U. S.; PARDO. J. M.; RAGHOTAMA, K. G. Phosphate Transporters from the Higher Plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 93, n. 19, p. 10519-10523, Sept. 1996.

MUCHHAL, U. S.; RAGHOTAMA, K. G. Transcriptional Regulation of Plant Phosphate Transporters. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 96, n. 10, p. 5868-5872, May 1999.

MUDGE, S. R.; RAE, A. L.; DIATLOFF, E.; SMITH, F. W. Expression Analysis Suggests Novel Roles for Members of the Pht1 Family of Phosphate Transporters in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 31, p.341-353. 2002.

MUDGE, S. R.; SMITH, F. W.; RICHARDSON, A. E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. *Plant Science*, Clare, v. 165, n. 4, p. 871-878, Oct. 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEUMANN, G.; MASSONNEAU, A.; LANGLADE, N.; DINKELAKER, B.; HENGELER, C.; ROMHELD, V.; MARTINOIA, E. Physiological Aspects of



Cluster Root Function and Development in Phosphorus-deficient White Lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany*, London, v. 85, n. 6, p. 909-919, June 2000.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDEZ-MELARA, M.; TÉLLEZ-RODRÍGUEZ, P.; PONS-HERNÁNDEZ, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Reporters*, New York, v. 21, n. 4, p. 302-312, Nov. 2002.

OFFRINGA, R.; VAN DEN ELZEN, P. M. J.; HOOYKAAS P. J. J. Gene Targeting in Plants Using the *Agrobacterium Tumefaciens* Vector System. *Transgenic Research*, Dordrecht, v. 1, n. 3, p. 114-123, 1992.

OSHIMA, Y.; OGAWA, N.; HARASHIMA, S. Regulation of phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* – a review. *Gene*, Amsterdam, v. 179, n. 1, p. 171-177, Nov. 1996.

PETERHANS, A.; DATTA, S. K.; DATTA, K.; GOODALL, G. J.; POTRYKUS, I.; PASZKOWSKI, J. Recognition efficiency of Dicotyledoneae-specific promoter and RNA processing signals in rice. *Molecular and General Genetics*, New York, v. 222, n. 2/3, p. 361-368, July 1990.

PIETERS, A. J.; PAUL, M. J.; LAWLOR, D. W. Low sink demand limits photosynthesis under P<sub>i</sub> deficiency. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1083-1091, May 2001.

PRZETAKIEWICZ, A.; KARAS, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Polyploid Cereals. the Efficiency of Selection and Transgene Expression in Wheat. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Wroclaw, Poland, v. 9, n. 4B, p. 903-917, 2004.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, New York, v. 216, n. 1, p. 23-37, Nov. 2002.

RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, S.; JANSKA, J.; LALOI, M.; LEGGEWIE, G.; AMRHEINK, N.; BUCHER, M. A phosphate transporter

expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature*, London, v. 414, n. 6862, p. 462-466, Nov. 2001.

REPELLIN, A.; BAGA, M.; JAUHAR, P. P.; CHIBBARL, R. N. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer. *New challenges Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 64, n. 2/3, p. 159-183, 2001.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A.; HAYES, J. E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal*, Oxford, v. 25, n. 6, p. 641-649, Mar. 2001.

RITALA, A.; ASPEGREN, K.; KURTEN, U.; SALMENKALLIO-MARTTILA, M.; MANNONEN, L.; HANNUS, R.; KAUPPINEN, V.; TEERI, T. H.; ENARI, T. Fertile Transgenic Barley by Particle Bombardment of Immature Embryos. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 317-325, Jan. 1994.

ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T. . Gene transfer in plants: production of transformed plants using Ti plasmid vectors. *Methods in Enzymology*, San Diego, v. 118, p. 627-640, 1986.

ROMBAUTS, S.; FLORQUIN, K.; LESCOT, M.; MARCHAL, K.; ROUZÉ, P.; VAN de PEER, Y. Computational Approaches to Identify Promoter and cis-Regulatory Elements in Plant Genomes. *Plant Physiology*, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1162-1176, July 2003.

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- SPI, 1998.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L.; Function Andmechanism Of Organic Anionexudation From Plant Roots. *Annual Review of Plant Physiology in Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.

RYAN, P. R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G. P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S. D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 94, n. 12, p. 6547-6552, July 1997.

RUBIO, V.; LINHARES, F.; SOLANO, R.; MARTIN, A. C.; IGLESIAS, J.; LEYVA, A.; PAZ-ARES J. A conserved MYB transcription factor in phosphate

starvation signalling both in vascular plants and in unicellular algae. **Genes and Development**, Plainview, v. 15, n. 16, p. 2122-2133, Aug. 2001.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America Biological Sciences**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

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

SANFORD, J.C.; SMITH, F.D.; RUSSELL, J.A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. Ed. **Recombinant DNA – Part H. San Diego: Academic Press**. p. 483-510 (Methods in Enzymology, 217). 1993

SAS, L.; RENGEL, Z.; TANG, C. Excess cation uptake, and extrusion of protons and organic acid anions by *Lupinus albus* under phosphorus deficiency. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 6. p. 1191-1198, May 2001.

SCHINDLER, U.; BECKMANN, H.; CASHMORE, A. R. TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 1309-1319, 1992.

SCHÜNEMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; SMITH, F. W.; DELHAIZE, E. Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 398, p. 855-865, Apr. 2004a.

SCHÜNEMANN, P. H. D.; RICHARDSON, A. E.; VICKERS, C. E.; DELHAIZE, E. Promoter Analysis of the Barley Pht1;1 Phosphate Transporter Gene Identifies Regions Controlling Root Expression and Responsiveness to Phosphate Deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 4, p. 4205-4214, Dec. 2004b.

TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of Transformation Conditions and Production of Transgenic Sorghum (*Sorghum bicolor*) via Microparticle Bombardment. **Plant Cell**, Rockville, v. 75, p. 1-18, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

UHDE-STONE, C.; GILBERT, G.; JOHNSON, J. M-F.; LITJENS, R.; ZINN, K. E.; TEMPLE, S. J.; VANCE, C. P.; ALLAN, D. L. Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 248, n. 1/2, p. 99-116, Mar. 2003.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, Oxford, v. 157, n. 3, p. 423-447, Mar. 2003.

VARADARAJAN, D. K.; KARTHIKEYAN, A. S.; DURZO, P. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphite, an Analog of Phosphate, Suppresses the Coordinated Expression of Genes under Phosphate Starvation. *Plant Physiology*, Rockville, v. 129, n. 3, p. 1232-1240, July 2002.

WANG, F. Z.; WANG, Q. B.; KWON, S. Y.; KWAK, S. S.; SU, W. A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*, v. 162, n. 4, p. 465-472, Apr. 2005.

WASAKI, J.; YONETANI, R.; KURODA, S.; SHINANO, T.; YAZAKI, J.; FUJII, F.; SHIMBO, K.; YAMAMOTO, K.; SAKATA, K.; SASAKI, T.; KISHIMOTO, N.; KIKUCHI, S.; YAMAGISHI, M.; OSAKI, M. Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1515-1523, Sept. 2003a.

WASAKI, J.; YONETANI, R.; SHINANO, T.; KAI, M.; OSAKI, M. Expression of the OsPII gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. *New Phytologist*, Oxford, v. 158, n. 2, p. 239-248, May 2003b.

WINICOV, I.; VALLIYODAN, B.; XUE, L.; HOOBER, J. K. The MsPRP2 promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of Alfin 1. *Planta*, New York, v. 219, n. 6, p. 925-935, Oct. 2004.

WU, P.; MA, L.; HOU, X.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, F.; DENG, X. W. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 3, p. 1260-1271, July 2003.

XU, M.; JIANG, J.; GE, L.; XU, Y.; CHEN, H.; ZHAO, Y.; BI, Y.; WEN, J.; CHONG, K. FPF1 transgene leads to altered flowering time and root development in rice. **Plant Cell Reporters**, New York, v. 24, n. 2, p. 79-85, May 2005.

YAN, F.; ZHU, Y.; MÜLLER, C.; ZÖRB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H<sup>+</sup>-Pumping and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiology**, Oxford, v. 129, n. 1, p. 50-63, May 2002.

ZHANG, S. H.; LAWTON, M. A.; HUNTER, T.; LAMB, C. J. *atpk1*, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*: I. Isolation, characterization, and expression. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 26, p. 17586-17592, July 1994.