

***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 20**

Ativação do Promotor *AtPT2* de *Arabidopsis thaliana* sob Estresse de Fósforo em Plantas Transgênicas de Milho

Andréa A. Carneiro
Carlos H. S. Carvalho
Gracielle T. C. P. Coelho
Isabel R. P. Souza
Luciano V. Paiva
Newton P. Carneiro
Robert E. Schaffert
Rosângela L. Brandão
Vera M. Carvalho Alves

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição

1ª impressão (2010): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Ativação do promotor AtPT2 de *Arabidopsis thaliana* sob estresse de fósforo em plantas transgênicas de milho / Andréa Almeida Carneiro ... [et al.]. -- Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.

15 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1217-1981; 20).

1. Planta transgênica. 2. Gene. 3. Milho. 4. *Zea mays*. I. Carneiro, Andréa Almeida. II. Série.

CDD 631.523 (21. ed.)

Sumário

Introdução.....	5
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	11
Referências	13

Ativação do Promotor *AtPT2* de *Arabidopsis thaliana* sob Estresse de Fósforo em Plantas Transgênicas de Milho

Andréa A. Carneiro¹
Carlos H. S. Carvalho
Gracielle T. C. P. Coelho
Isabel R. P. Souza
Luciano V. Paiva
Newton P. Carneiro
Robert E. Schaffert
Rosangela L. Brandão
Vera M. Carvalho Alves

Introdução

O Cerrado compreende uma área de aproximadamente 205 milhões de hectares do território Brasileiro, sendo o seu solo caracterizado por uma baixa fertilidade, baixo pH, baixa disponibilidade de fósforo, alta capacidade de fixação de fósforo, e níveis tóxicos de alumínio. Mais de 15 milhões de hectares desta região já foram transformados em solos produtivos, devido a pesquisas multidisciplinares, e respondem atualmente por 25% da safra brasileira de milho, soja e arroz (IBGE, 2009; CASTILLO, 2007). Um dos grandes desafios para aumentar a produção agrícola do Cerrado é o desenvolvimento de plantas melhor adaptadas a estas condições desfavoráveis do solo.

¹Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424 Km 65, 35701-970, Sete Lagoas, MG. andreac@cnpmc.embrapa.br

As técnicas de biologia molecular e a geração de plantas transgênicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento de cultivares mais produtivos, tolerantes a diferentes estresses ambientais, incluindo a baixa disponibilidade de fósforo no solo. O melhoramento de plantas via engenharia genética depende da regulação espacial e temporal da expressão do gene de interesse, o que é feito basicamente pela região promotora utilizada na construção gênica (MARTINEZ, 2002; ROMBAUTS et al., 2003). A utilização de promotores específico de raízes, responsivos à baixa disponibilidade de fósforo no ambiente, para direcionar a expressão de genes relacionados a tolerância ao estresse de fósforo, tais como transportadores de fosfato ou fosfatases (MUCHHAL et al., 1996; RAGHOTHAMA, 1999) pode ser uma alternativa para aumentar a produção em ambientes sujeitos a este tipo de estresse.

Promotores que direcionam a expressão gênica especificamente para as raízes na ausência de fósforo, tais com *AtPT2* (Transportador de fosfato 2 de *Arabidopsis thaliana*) já foram isolados e caracterizados (KARTHIKEYAN et al., 2002). O gene *AtPT2* é um dos membros da família gênica *Pht1* ou transportadores de fosfato de alta afinidade, e foi isolado de *A. thaliana*. A concentração do mRNA deste gene aumenta em resposta a baixos níveis de fósforo no ambiente (MUCHHAL et al., 1996). A expressão dos genes repórteres GFP (Green fluorescent protein), luciferase, ou GUS (β -glucuronidase) controlada por uma região de 2,3 kb do promotor do gene *AtPT2*, em plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco foi identificada, predominantemente, em raízes crescidas na ausência de fósforo (KARTHIKEYAN et al., 2002).

O promotor *AtPT2* é altamente desejável como um instrumento para direcionar a expressão de genes em tecidos específicos de monocotiledôneas economicamente importantes como o milho. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de analisar o padrão de expressão do gene repórter GUS controlado pelo promotor *AtPT2* em plantas transgênicas de milho. Os resultados obtidos mostram que a expressão do gene reporter controlado pelo promotor *AtPT2* foi semelhante a obtida em plantas de *A. thaliana*. Também confirmam que o

promotor *AtPT2* é útil para direcionar a expressão de genes heterólogos em raízes de milho, o que pode auxiliar na maior aquisição de fósforo sem um gasto supérfluo de energia.

Materiais e Métodos

Construção gênica

Uma sequência de 2318 bp da região 5' não codante do gene *AtPT2* (KARTHIKEYAN et al., 2002) foi isolada através de amplificação por PCR e, subclonada na frente da região codante do gene repórter *GUS* (β -glucuronidase) presente no vetor *pGPTV* (BECKER et al., 1992) (Figura 1).

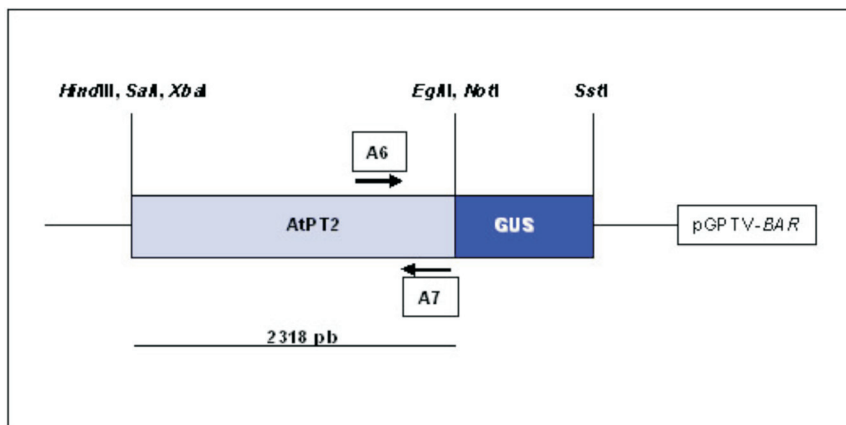


Figura 1. Construção Gênica *AtPT2.GUS* no Vetor Binário *pGPTV*. *HindIII*, *SmaI*, *XbaI*, *EcoRI*, *NotI*, *SstI*: sítios enzimáticos; A6 e A7: primers.

Transformação Genética de Milho

Para a produção de milho transgênico via biobalística, foi desenvolvido um protocolo na Embrapa Milho e Sorgo, onde embriões imaturos da linhagem A188, medindo entre 1,0 - 1,5 mm, foram isolados em condições estéreis e cultivados durante 28 dias em meio CI (CHU et al., 1975) suplementado com 2,4-D. Durante o bombardeamento foram utilizadas micropartículas de

tungstênio aceleradas através de um aparelho movido à hélio. Um estoque de micropartículas de tungstênio foi preparado ressuspendendo 60 mg tungstênio M10 (Sylvania, GTE Chemicals/ Towanda – USA) em 1 ml de uma solução 50% glicerol estéril. DNA plasmidial, construção contendo o gene repórter GUS sob o controle do promotor *AtPT2* -*Arabidopsis thaliana* Transportador de Fosfato 2 (MUCHHAL et al., 1996; KARTHIKEYAN et al., 2002) *AtPT2::GUS::NOS*, foi precipitado sobre 50 µl da solução estoque de tungstênio. As partículas de tungstênio cobertas com DNA foram cuidadosamente lavadas e ressuspensas em 60 µl de etanol 100%. Seis microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (DuPont, São Paulo, SP). Estas membranas foram usadas no bombardeamento de calos embriogênicos de milho utilizando 1100 psi de pressão de gás hélio, 1,6 µg/tiro de DNA plasmidial e os explantes foram posicionadas à 6 cm 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 (8 mm), distância entre a membrana carreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg).

A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 14 dias após bombardeamento quando os calos de milho foram transferidos para meio CI sem prolina e suplementado com o herbicida Finale (glufosinato de amônia). Calos foram subcultivados a cada duas semanas em dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 e 9 mg/l). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura, capazes de crescer em presença do agente seletivo, foram transferidas para solo em casa de vegetação.

Análises Moleculares

DNA genômico foi isolado de plantas de milho transformadas usando o protocolo de Dellaporta et al. (1983). A presença de um fragmento de 588 pb da construção gênica *AtPT2::GUS::NOS* foi confirmada utilizando os primers A6 (CCA GTG TCT CCG TTC ACC TT) e A7 (AAC GGA TCC TCT TCT CCT CTG CAA), após 30 ciclos (15"- 94°C, 15"- 55°C, 15"- 72°C), e uma extensão final a 72°C durante 7min. Os produtos amplificados

foram separados em gel de 0.8% agarose em tampão TAE. Gels foram tratados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV, as imagens foram estocadas no sistema de documentação fotográfica Eagle Eye II (Stratagene).

Expressão do Gene Repórter GUS

Para avaliar a localização da expressão da enzima β -glucuronidase (gene repórter *GUS*), controlado pelo promotor *AtPT2* foi realizada a detecção histoquímica. Plantas foram incubadas a 37°C por 20 h em solução contendo 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D glucuronide (X-Gluc, Sigma, São Paulo, SP), 50 mM tampão fosfato pH 6.8, 20% metanol, 1% Triton X-100 (RUEB; HENSGENS, 1998). A clorofila foi extraída dos tecidos foliares utilizando banhos de 70% etanol por 30 - 60 min.

Para esses teste sementes T1 foram germinadas a 30° C durante sete dias e as plântulas transferidas para solução completa de acordo com Magnavaca (1982) (Tabela 1), após 4 dias metade das plântulas foram transferidas para solução sem fósforo e, a outra metade continuou na solução completa durante mais 6 dias para a ativação do promotor *AtPT2* e do gene *GUS*.

Tabela 1. 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	Ânion	Elem	mg/L	µM
Ca	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	270	3,08	Ca:11,1	NO ₃ ⁻ -N:98,6	Ca	141,1	3527
	NH ₄ NO ₃	33,8		NH ₄ ⁺ -N:18,2	NO ₃ ⁻ -N:18,2	K	90,1	2310
						Mg	20,8	855
K	KCl	18,6	2,31	K:22,5	Cl:20,4	NO ₃ ⁻ -N	152,0	10857
	K ₂ SO ₄	44,0		K:45,6	SO ₄ ⁻ -S:17,7	NH ₄ ⁺ -N	18,2	1300
	KNO ₃	24,6		K:22,0	NO ₃ ⁻ -N:7,9	P	1,4	45
						S	18,8	587
Mg	Mg(NO ₃) ₂	142,4	1,54	Mg:20,8	NO ₃ ⁻ -N:24,0	B	0,27	25
P	KH ₂ PO ₄	17,6	0,35	K:1,7	H ₂ PO ₄ ⁻ :1,4	Fe	4,3	77
						Mn	0,5	9,1
Fe	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	20,3	1,54	Fe:4,3	NO ₃ ⁻ -N:3,3	Cu	0,04	0,63
	HEDTA	13,4			HEDTA:0,26	Mo	0,08	0,83
Micro			0,77			Zn	0,15	2,29
Mn	MnCl ₂ ·4H ₂ O	2,34		Mn:1,5	Cl:0,65	Na	0,04	1,74
B	H ₃ BO ₃	2,04			BO ₃ ⁻ -H:0,27	HEDTA	20,06	75
Zn	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,88		Zn:0,15	SO ₄ ⁻ -S:0,07			
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,20		Cu:0,04	SO ₄ ⁻ -S:0,02			
Mo	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,26		Na:0,04	MoO ₄ ⁻ -M:0,08			

Resultados e Discussão

O gene *AtPT2* codifica para uma proteína de membrana transportadora de fosfato em *Arabidopsis thaliana* (MUCHHAL et al., 1996). Sua atividade foi detectada principalmente em raízes quando a planta é submetida ao estresse de fósforo. De acordo com Mukatira et al. (2001) 5 dias sob estresse de fósforo são suficientes para a ativação, nas raízes, do promotor *AtPT2*. Também foi detectada esporadicamente em folhas sob o estresse de fósforo prolongado. Com o objetivo de estudar o funcionamento do promotor *AtPT2*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, no sistema heterólogo milho, aproximadamente 2.300 bp da região 5' não codante do gene foi subclonada na frente da região codante do gene repórter GUS.

A presença da construção *AtPT2::GUS::NOS* foi confirmada em 34 plantas de milho transgênicas produzidas, sendo 10 eventos diferentes. Estes eventos foram crescidos em casa de vegetação e a PCR com os primers específicos para o promotor, A6 e A7, amplificaram uma região de 588 pb (Figura 1), confirmando a presença da construção gênica nas plantas geradas (Figura 2).

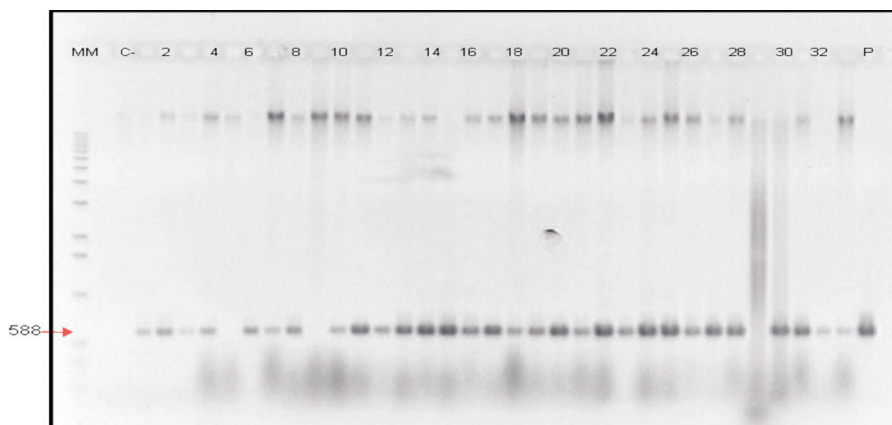


Figura 2. Plantas Transgênicas de Milho Contendo a Construção *AtPT2.GUS*. PCR Primers: A6 X A7; MM: 1 Kb Marcador Molecular; 0: Branco da reação de PCR; C-: Controle negativo, planta de milho não-transgênica; P: Construção gênica *AtPT2.GUS*; 1 a 35: DNA isolado de plantas transgênicas. Gel de agarose 0,8%.

A localização da enzima β -glucuronidase, nas plantas transgênicas geradas, foi detectada em ensaios histoquímicos para GUS (Figura 3). Na análise histoquímica, similar aos dados apresentados por Karthikeyan et al. (2002), a expressão do repórter gene GUS foi detectada apenas nos tratamentos onde as plantas de milho foram submetidas ao estresse de fósforo, sugerindo que plantas compartilham mecanismos regulatórios comuns para a ativação de genes envolvidos na resposta a este tipo de estresse. Entretanto, em oposição aos resultados obtidos com plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco, transformadas com esta mesma construção (KARTHIKEYAN et al., 2002), a expressão do gene repórter GUS foi detectada em folhas de um dos eventos transgênicos (Figura 3). Quantificação preliminar da expressão da β -glucuronidase em raízes e folhas dos diferentes eventos transgênicos produzidos (dado não apresentado) mostrou que a expressão da enzima nas raízes foi em média quatro vezes maior do que nas folhas.

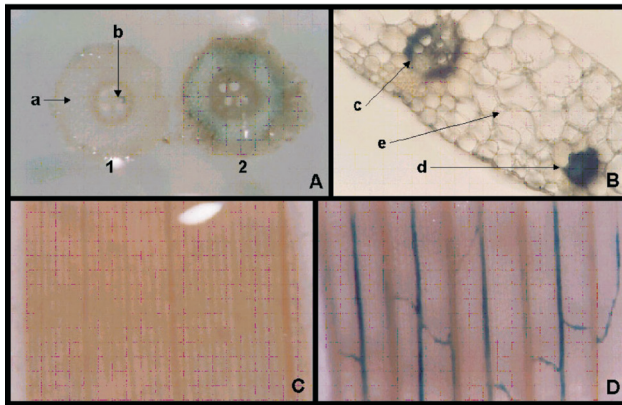


Figura 3. Expressão do Gene Repórter GUS em Plantas Transgênicas de Milho Contendo a Construção Gênica *AtPT2.GUS*. (A) Raíz de milho: 1) depois de 5 dias em solução nutritiva completa; 2) depois de 5 dias em solução nutritiva sem Pi; (B) Corte transversal da folha em solução nutritiva sem Pi; (C) Folha em solução nutritiva completa; (D) folha em solução nutritiva sem Pi. (a) cortex; (b) cilindro vascular; (c,d) feixe vascular; (e) parenquima.

Os resultados sugerem que os mecanismos de regulação do promotor *AtPT2* isolado de *A. thaliana*, possuem semelhanças com os mecanismos de regulação de genes envolvidos com o estresse de fósforo em milho. Entretanto, as regiões relacionadas com o direcionamento da expressão preferencial do gene *AtPT2*, em raízes de dicotiledôneas parecem não serem totalmente conservadas entre plantas de milho e *Arabidopsis*. Contudo, o envolvimento de transportadores de fosfato de alta afinidade na translocação interna de fósforo já foi proposto por diferentes autores (LIU et al., 1998; KARTHIKEYAN et al., 2002). Em conclusão este promotor é uma ferramenta útil que poderá ser empregada para direcionar a expressão preferencial de genes relacionados com o estresse de fósforo em raízes de milho, criando plantas mais adaptadas às condições do cerrado brasileiro.

Referências

- BECKER D.; KEMPER E.; SHELL J.; MASTERSON R. New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 20, p. 1195-1197, 1992.
- CASTILLO R. Agronegócio e logística em áreas de cerrado: expressão da agricultura científica globalizada. **Revista da ANPEGE**, v. 3, p. 33- 43, 2007.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y.; BI, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, Peking, v. 18, p. 659-668, 1975.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 1, p. 19-21, 1983.
- FUENTE, J. M.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA ESTRELA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, Washington, v. 276, p. 1566-1568, 1997.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em: 21 dez. 2009.

HOBBS, S. L. A.; KPODAR, P.; DELONG, M. O. The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 15, p. 851-864, 1990.

HOBBS, S. L. A.; WARKENTIN, T. D.; DELONG, C. M. O. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht v. 21, p. 17-26, 1993.

HUE, N. V.; CRADDOCK, G. R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 50, p. 28-34, 1986.

KARTHIKEYAN, A. S.; VARADARAJAN, D. K.; D'URZO, M. P.; DAMSZ, B.; RAGHOTHAMA, K. G. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, p. 221-233, 2002.

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**, Bethesda, v. 116, p. 91-99, 1998.

LÓPEZ-BUCIO, J.; DE LA VEJA, O. M.; GUEVARA-GARCÍA, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 450-453, 2000.

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.)**. 1982. 135 p. Tese (Doutorado) - University of Nebraska, Lincoln, 1982.

MARTINEZ, E. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 50, p. 925-947, 2002.

MUCHHAL, U. S.; PARDO, J. M.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 10519-10523, 1996.

MUKATIRA, U.T.; LIU, C.; VARADARAJAN, D. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Negative regulation of phosphate starvation-induced genes 1. **Plant Physiology**, Bethesda , v. 127, p. 1854-1862, 2001.

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

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

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**, Bethesda, v. 132, p. 1162-1176, 2003.

RUEB, S.; HENSGENS, L. A. M. Improved histochemical staining for b-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. **Rice Genetic Newsletters**, v. 6, p. 168-169, 1998.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 527-560, 2001.