

Sequenciamento do Motivo de Fosforilação de PEP-Carboxilases de Genótipos de Milho Contrastantes em Responsividade ao Nitrogênio.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

Antonio Alvaro C. Purcino¹, Luciana R Rodrigues², Daniela D.A. Pereira³, Anne C. Pinto³, Eliane A. Gomes¹, Claudia T. Guimarães¹, Newton P. Carneiro¹

¹Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.701-970 Sete Lagoas, MG, corsetti@cnpmc.embrapa.br, ²Bolsista DTI PADCT/CNPq, ³Bolsista BAP FAPEMIG

Palavras-chave: eficiência de uso de nitrogênio, PEPC, motivo de fosforilação, sequenciamento

Trabalhos conduzidos no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo mostraram que tanto a expressão da proteína PEPC quanto a atividade das suas formas fosforilada e desfosforilada são bastante responsivas ao nitrogênio. Entretanto, observou-se que a intensidade desta resposta era específica para cada genótipo. Observou-se nestes trabalhos que a forma fosforilada dos genótipos CMS 28-8.1, 723 x 64, CMS 28-10.2 e 723 x 11 foi altamente responsiva ao nitrogênio, enquanto que nos genótipos CMS 28-7.1, 724 x 22, CMS 28-17.2 e principalmente no 20 x 64, esta responsividade foi muito menor. Como a fosforilação é o principal mecanismo pós-traducional a regular a atividade desta enzima, uma pergunta torna-se óbvia frente a estes resultados: seriam estas diferenças em responsividade ao nitrogênio devido a diferenças na sequência de bases no motivo de fosforilação do gene da PEPC destes genótipos? Caso isto fosse verdadeiro, esta informação teria implicações práticas, já que isto possibilitaria a identificação de marcadores de DNA, que poderiam ser úteis em programas visando a produção de novos genótipos de milho com maior atividade da PEPC e, conseqüentemente, maior capacidade fotossintética e eficiência de uso de N (EUN). Portanto, o objetivo deste trabalho foi tentar descobrir possíveis diferenças nas seqüências de bases nos motivos de fosforilação de genótipos de milho cujas PEP-carboxilases mostraram-se contrastantes em resposta ao nitrogênio.

Material e Métodos

Os genótipos 20x64 (pouco responsivo), CMS 8.1 (relativamente responsivo) e CMS 10.2 (altamente responsivo) foram cultivados em vasos com vermiculita até 21 DAG, recebendo solução nutritiva completa com 0,8 ou 1,6 mM de nitrato. A extração do RNA total foi realizada pelo protocolo de Thompson et al (1993). A produção dos cDNAs foi feita utilizando-se o SuperScript™ One-Step RT-PCR conforme instruções do fabricante (GIBCO BRL) e primers específicos cobrindo uma parte do N-terminal da PEPC contendo o motivo de fosforilação. As seqüências dos primers utilizados na reação de RT-PCR aparecem na Tabela 1.

Primers	T _m	Sítio de restrição	Seqüência
F1	55	Kpn I	5'-CCGGTACCATGGCGTCGACCAAGGCTC-3'
R1	55	Xho I	5'-CTTGTCTCGAGCCACTCGC-3'
F2	50	Xho I	5'-GCGAGTGGCTCGAGGACAAG-3'
R2	50	Hind III	5'-GGAAGCTTAAACAAGTCCATCCAATGGGCTGG-3'
R1T	55	KpnI	5'-TTTGGTACCGGATGGAGCTCGCCACG-3'
R2T	55	KpnI	5'-TTTGGTACCACCTTTCTTGAGCTTGC-3'

* T_m :temperatura de anelamento ° C

Tabela 1 - Primers utilizados para amplificação de fragmentos da C4-PEPC de milho

Os cDNAs amplificados foram purificados através do kit Nucleospin Extraction (Clontech), clonados no vetor de expressão pT-Adv e transformados em *E. coli* TOP 10F'. A seleção dos clones positivos foi feita em meio contendo antibiótico, X-Gal e IPTG. As colônias brancas selecionadas foram submetidas a extração de DNA plasmidial e, para confirmar a presença de inserto, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Os clones mostrando a presença do inserto foram sequenciados no ABI PRISM 377 DNA Sequencer, conforme o protocolo desenvolvido pelo fabricante (Perkin Elmer).

Resultados

A Figura 1 mostra a qualidade dos RNA totais obtidos de cada material experimental

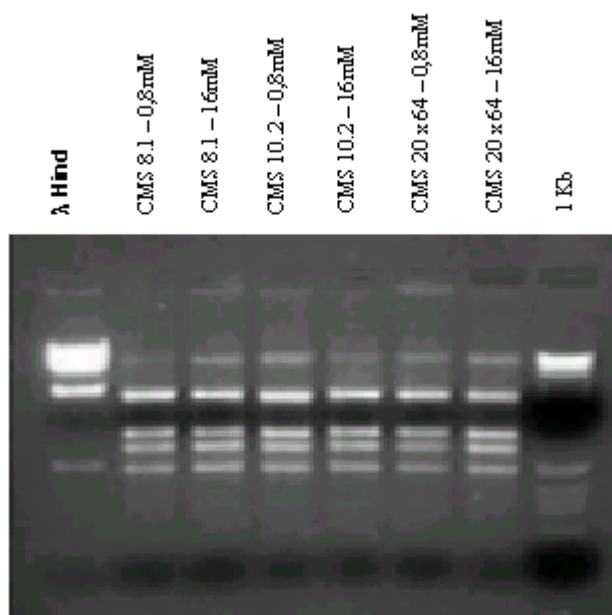


Figura 1 - Eletroforese dos RNAs totais (1 µg) extraídos de genótipos de milho com resposta diferencial da C4-PEPC para níveis de nitrogênio.

Nos primeiros experimentos tentou-se amplificar o fragmento inteiro da isoforma C4 da PEPC (6,7 Kb), a partir do RNA total, usando os primers F1 e R2 (Tabela 1) conforme o esquema da Figura 2

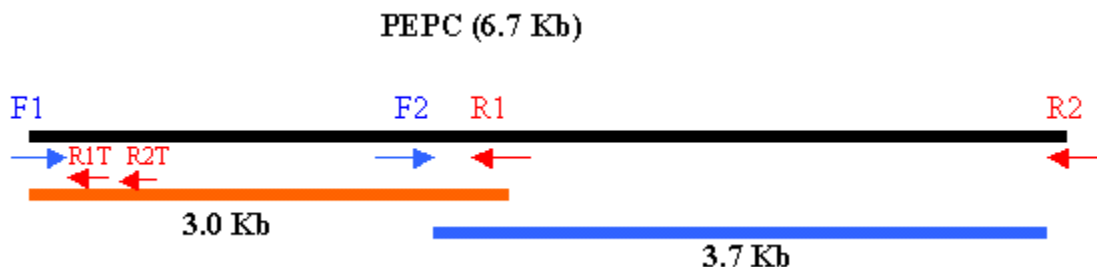


Figura 2 - Fragmentos da PEPC que foram amplificados utilizando os primers indicados pelas setas e listados na Tabela 1

Os resultados não foram satisfatórios, pois a Taq polimerase usada amplificava somente fragmentos de até 5 kb. Portanto, passou-se a usar combinações de primers de regiões específicas da PEPC para amplificar separadamente fragmentos menores da região N-terminal que contem o motivo de fosforilação. Para tanto, utilizou-se os primers F1 x R1, F1 x R1T e F1 x R2T conforme a Figura 2. Os resultados apresentados na Figura 3 demonstraram que é possível amplificar estes fragmentos da PEPC, utilizando a temperatura de 50°C para anelamento dos primers. O sequenciamento dos fragmentos obtidos a partir dos clones positivos aparecem na Tabela 2. O domínio de fosforilação da PEPC em plantas possui a seguinte seqüência: **E/DR/KxxSIDAQL/MR** (glutamato/aspartato/arginina/lisina/xx/**serina**/isoleucina/
/aspartato/alanina/glutamina/leucina/metionina/arginina (Lepeniec et al., 1994). O sitio de fosforilação é o resíduo de serina. A PEPC no seu estado fosforilado é menos sensível à inibição por malato e, portanto, apresenta uma atividade mais alta que sua forma desfosforilada. Como a seqüência de fosforilação **EKHHSIDAQLR** mostrou-se conservada em todos clones sequenciados, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as diferenças em responsividade ao nitrogênio, observadas na C4-PEPC extraída das folhas dos genótipos utilizados neste trabalho, não são devidas a diferenças na seqüência de bases no motivo de fosforilação do gene C4-*pepc*. Portanto, a responsividade da atividade da PEPC ao nitrogênio nestes genótipos é regulada pela expressão da proteína PEPC e não por diferenças na seqüência de base deste gene.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Edna P.P Pinho pela assistência laboratorial e a FAPEMIG, processo CAG 965/97, pelo apoio financeiro.

Literatura citada

Thompson et al. 1983. Planta 158:487-500

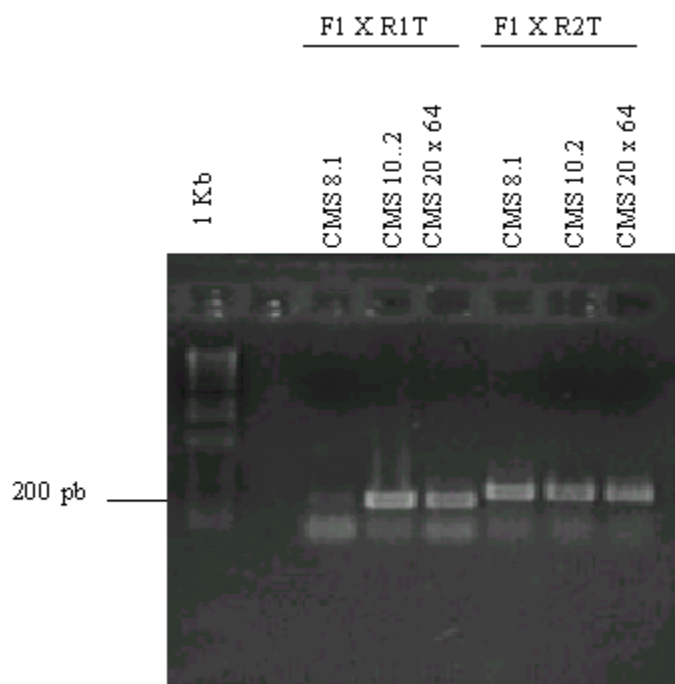


Figura 3 - Amplificação dos fragmentos F1 x R1T e F1 x R2T contendo o motivo de fosforilação da PEPC.

Genótipo 10.2 Primer F1R1T

- Clone 1 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR
- Clone 2 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR
- Clone 3 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR

Genótipo 10.2 Primer F1R2T

- Clone 1 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR
- Clone 2 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR

Genótipo 20 x 64 Primer F1R1T

- Clone 1 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR
- Clone 2 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVEDDKLI EYDALLVDR

Genótipo 8.1 Primer F1R1

Clone 1 - MASTKAPGPG**EKHHSIDAQLR**QLVPGKVSEDDKLIEYDALLVDR

Tabela 2 - Alinhamento das seqüências contendo o motivo de fosforilação (em vermelho) da PEPC nos genótipos

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
