

# Os Mecanismos de Tolerância ao Alumínio nas Linhagens de Milheto Cateto 237 e L3 Incluem a Expressão de Genes Comuns e Genes Específicos a cada Linhagem.

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

Antonio Alvaro C. Purcino<sup>1</sup>, Newton P. Carneiro<sup>1</sup>, Vera Maria C. Alves<sup>1</sup>, Claudia T. Guimarães<sup>1</sup>, Sidney N. Parentoni<sup>1</sup>, Luciana B. Rodrigues<sup>2</sup>, Eliane A. Gomes<sup>1</sup>, Silvia N. Jardim<sup>3</sup>, Bruno G. M. Churata<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.7001-970 Sete Lagoas, MG, corsetti@cnpsms.embrapa.br, <sup>2</sup>Bolsista DTI PADCT/CNPq, <sup>3</sup>Bolsista DTI do CNPq, <sup>4</sup>Bolsista Recém-doutor da FAPEMIG.

Palavras-chave: RT-PCR, hibridação subtrativa, PCR supressivo, toxidez de Al

A toxidez de Al é o principal problema para o desenvolvimento de uma agricultura competitiva e sustentável em solos ácidos. Entretanto, os solos ácidos cobrem vários milhões de hectares dos cerrados do Brasil Central e são uma das últimas fronteiras agrícolas que poderia ser utilizada para a produção de alimentos. Apesar de o milho mostrar baixa variabilidade genética para a toxidez de alumínio é possível identificar genótipos que apresentam importantes mecanismos de tolerância a este mineral. Trabalhos prévios com as linhagens Cateto 237 e L3 mostraram que elas diferem em seus mecanismos de tolerância a este estresse. Enquanto a Cateto 237 é tolerante ao estresse de Al em solução nutritiva, a linhagem L3 mostra boa capacidade produtiva em solos ácidos com alta saturação de Al. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar os genes que conferem tolerância ao Al nestas duas linhagens. A identificação destes genes é importante pois estes poderiam ser utilizados como marcadores moleculares visando encurtar o tempo de desenvolvimento de novos genótipos tolerantes ao Al, ou utilizados para desenvolvimento de cultivares tolerantes a este mineral via produção de transgênicos.

## Material e Métodos

Aproximadamente 2000 sementes das linhagens Cateto 237 e L3 foram germinadas em condições assépticas por 5 dias, selecionadas por uniformidade e cultivadas em solução nutritiva de Steinberg, pH 5,5 por 24 h. Após este período, renovou-se a solução nutritiva, abaixou-se o pH para 4,2 e metade das plantas de cada genótipo passou a ser cultivada em presença de 222  $\mu\text{M L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 1 ou 4 horas. A outra metade foi cultivada sem a presença do Al. Depois da imposição do estresse, os ápices das raízes foram coletados e utilizados para extração dos mRNAs e produção das bibliotecas de cDNAs necessárias para a identificação dos genes induzidos pelo Al nestas linhagens através das técnicas de hibridação subtrativa e PCR supressivo (Diatchenko et al., 1996). Para isto, para cada genótipo individualmente, os cDNAs das plantas tratadas com Al (testers) e das plantas não tratadas com Al (drivers) foram digeridos com *Rsa* I. Os cDNAs testers foram a seguir divididos em duas alíquotas, sendo que uma recebeu o adaptador 1 e a outra o adaptador 2. Uma primeira hibridação foi realizada entre os cDNAs testers e os cDNA drivers e uma

segunda hibridação foi feita entre os produtos da primeira hibridação com os cDNAs drivers desnaturado. Estas duas hibridações levam à equalização biblioteca de cDNAs obtida e permite o enriquecimento das seqüências induzidas pelo Al. Estas seqüências podem então ser amplificadas por duas reações de PCR, primeiramente utilizando-se um par de primers que anelam-se externamente aos adaptadores colocados nos testers, seguido de outra reação utilizando-se primers que anelam-se internamente aos adaptadores. Estes produtos de PCR foram clonados no vetor pT-Adv e transformados em *E. coli* TOP 10 F'. Após seleção em meio contendo antibiótico, X-Gal e IPTG, as colônias brancas foram digeridas com ECO R1 para comprovação da presença de insertos e a seguir sequenciadas no ABI PRISM DNA Sequencer conforme protocolo descrito pelo fabricante (Perkin Elmer). A busca por homologia com seqüências depositadas no GenBank foi realizada pelo software BLAST e a busca por informações sobre funções foi realizada através de pesquisa no portal Medline.

### **Resultados e Conclusões**

Na Figura 1 aparecem os resultados típicos obtidos durante a extração dos RNAs totais e a purificação dos mRNAs, de plantas tratadas com e sem Al. As bandas observadas pela eletroforese do RNA total referem-se a presença de RNAs ribossomais. O mRNA é a "nuvem" presente entre e abaixo destas bandas ribossomais. A purificação do mRNA, o qual possui uma calda poli A foi feita utilizando-se uma coluna de afinidade oligodT. Estes mRNAs foram então utilizados para produzir os respectivos cDNAs como mostrados na Figura 2. Estes cDNAs depois de digeridos com Rsa 1 e, no caso dos cDNAs de plantas tratadas com Al, receberam os adaptadores 1 e 2 conforme o esquema necessário para os passos de hibridação subtrativa e PCR supressivo. Na Figura 2 são mostrados os esquemas de clonagem dos produtos do segundo PCR e a seleção dos clones positivos em meio contendo antibiotico, X-Gal e IPTG. As colônias brancas da Figura 3 foram digeridas com Eco R1 e aquelas que mostravam a presença de insertos como mostrado na Figura 4, foram sequenciadas. As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank e os resultados mostraram que o Al induziu a expressão de 15 genes específicos na linhagem Cateto 237, 8 genes específicos à linhagem L3 e 7 genes comuns as estas duas linhagens. A busca por possíveis mecanismos de ação destes genes no portal Medline mostrou que estes genes estão geralmente associados a mecanismos de proteção aos estresses oxidativo, salino, temperatura e ferimento. Nas duas linhagens foram encontrados genes envolvidos na síntese da parede celular e na organização do citoesqueleto. Adicionalmente, foram encontrados várias seqüências que não mostraram homologia com dados do GenBank, sugerindo que elas podem representar novos genes que ainda não foram descritos na literatura. Portanto, é possível que existam nestas linhagens de milho mecanismos de tolerância ao alumínio ainda desconhecidos.

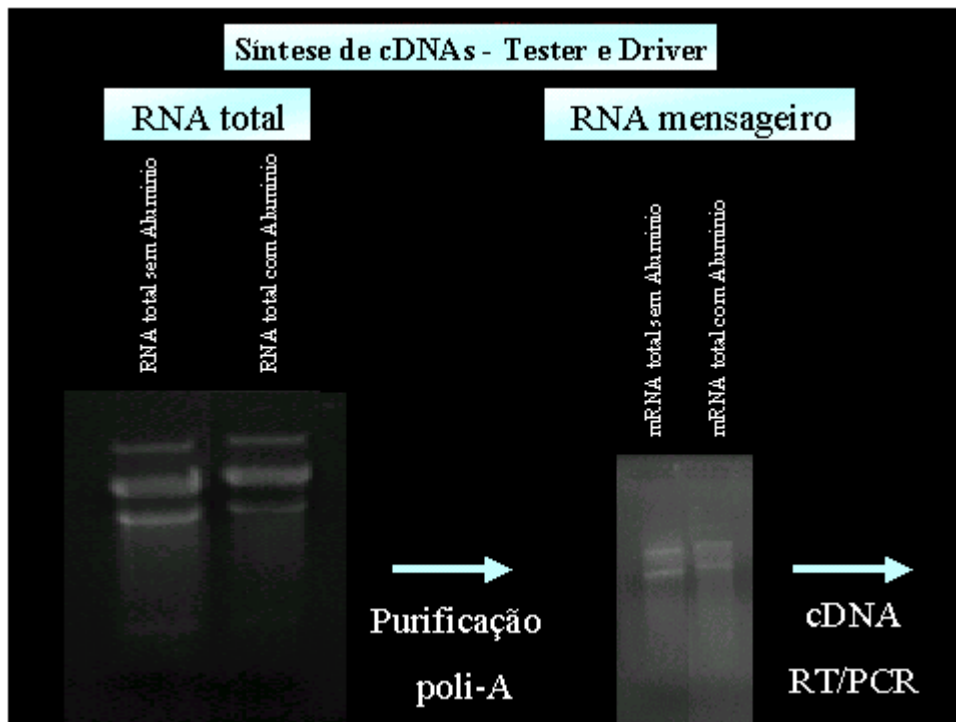


Figura 1 - Resultados típicos obtidos durante a extração dos RNAs totais e mRNAs utilizados para produção dos cDNAs testers e drivers

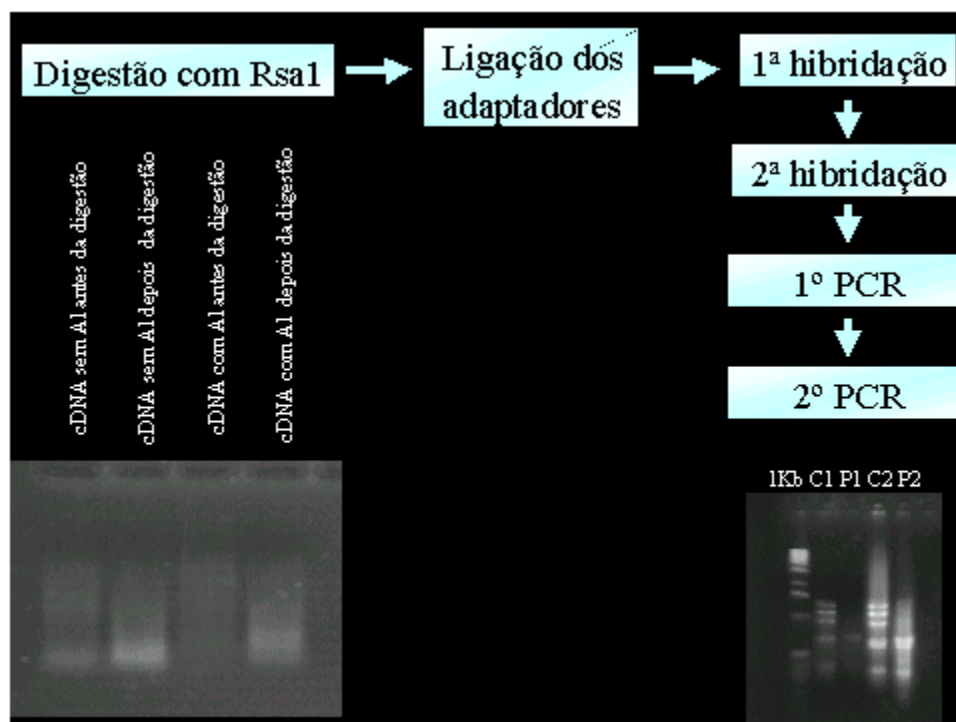


Figura 2 - No canto esquerdo aparecem os cDNAs das plantas tratadas com e sem Al antes e depois da digestão com Rsa1 e no lado direito aparecem os produtos da primeira e segunda reação de PCR

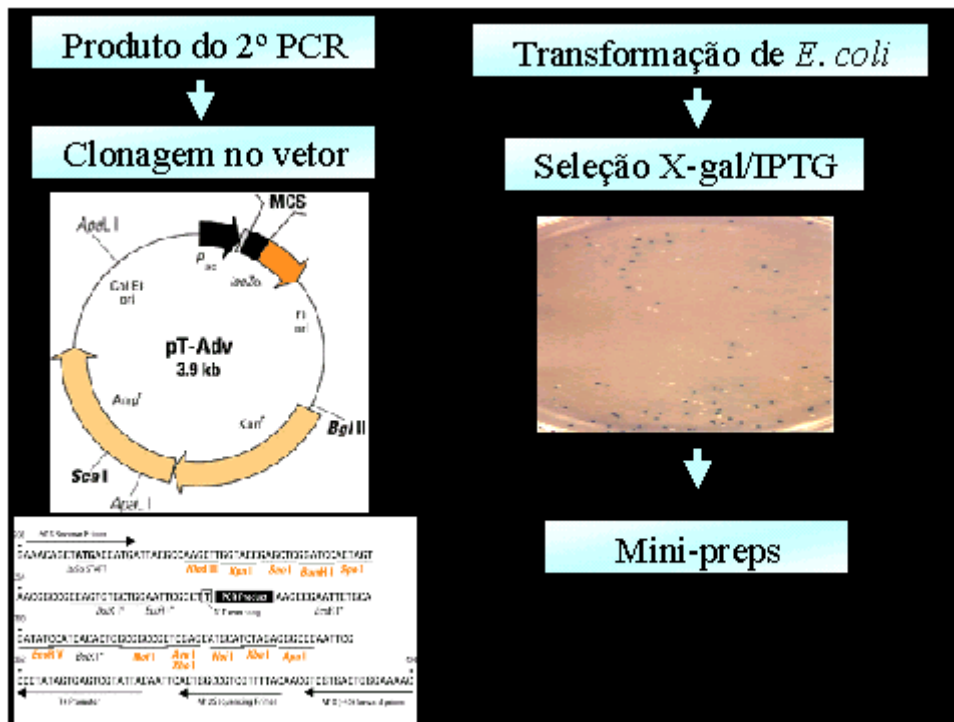


Figura 3 - Esquema de clonagem dos produtos de PCR, clonagem e seleção dos clones positivos em meio contendo antibiótico, X-Gal e IPTG.

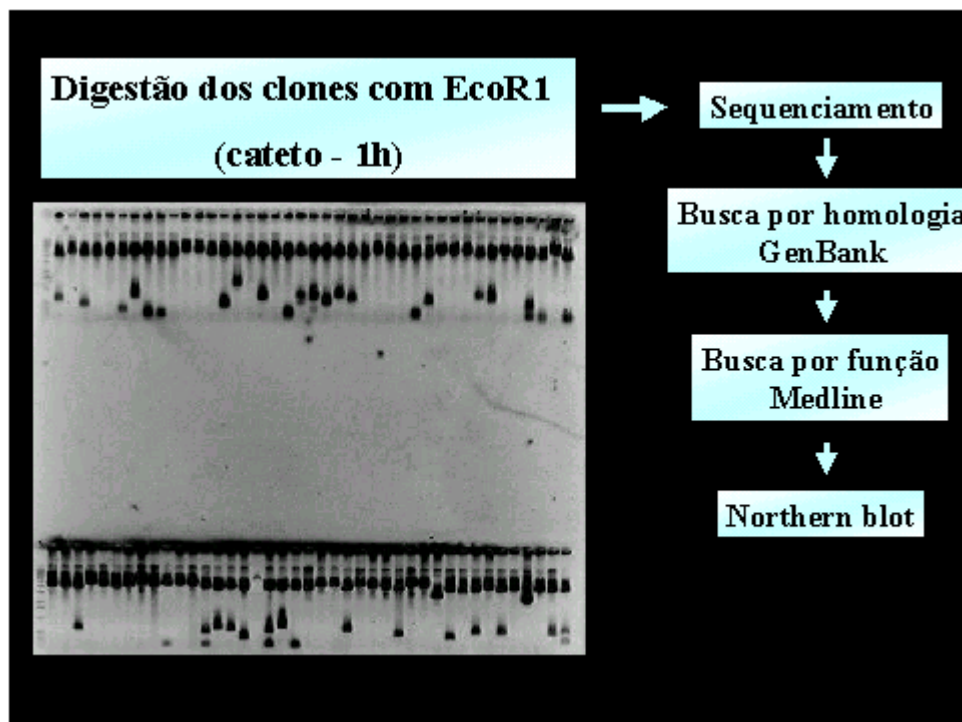


Figura 4 - Digestão dos clones positivos com Eco-R1. Os clones com a presença de inserto forma sequenciados no ABI PRISM 377.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem a Edna P.P. de Pinho pela assistência laboratorial e ao PADCT/CNPq pelo apoio financeiro.

**Literatura citada**

Diatchenko L., Lau Y-F.C, Campbell, A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E. Siebert P.D. 1996. Supression subtrative hybridization: A method for generatrng differentially regulated or tissue-specific cDNAs probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:6025-6030.

---

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

---