

# Caracterização de Genes Especificamente Induzidos por Alumínio em Ápices de Raízes de Braquiária

[Previous](#) [Top](#) [Next](#)



XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 29/08 a 02/09 de 2004 - Cuiabá - Mato C

UBIRACI G. P. LANA, ELIANE A. GOMES, NEWTON P. CARNEIRO, CLAUDIA T. GUIMARÃES, VERA M. C. ALVES, SILVIA N. JARDIM e ANTÔNIO A. C. PURCINO\*

Embrapa Milho e Sorgo, C. P. 151 Sete Lagoas, MG, 35701-970

[\\*corsetti@cnpms.embrapa.br](mailto:corsetti@cnpms.embrapa.br)

Palavras-chave: *Brachiaria decumbens*, tolerância ao alumínio, biblioteca subtrativa

## Introdução

A toxidez ao alumínio (Al) é um dos principais entraves para o desenvolvimento de uma agricultura competitiva e sustentável nos solos ácidos do cerrado brasileiro. O fato do alumínio prejudicar o desenvolvimento das plantas já foi reconhecido há mais de 70 anos. Em pH levemente ácido ou neutro, o Al é encontrado em formas insolúveis como silicatos, óxidos e cloretos. No entanto, em solos ácidos, formas fitotóxicas de alumínio, na forma de  $Al^{3+}$ , são liberadas em concentrações que afetam as raízes e, conseqüentemente, o crescimento e a produtividade da planta (Kochian, 1995). O Al induz efeitos diretos (Matsumoto, 2000) e indiretos nas plantas (Horst et al., 1997; Ma, 2000). Em várias espécies, o estresse por Al induz degradação de tilacóides, causa redução na concentração de clorofila *a* e *b* e inibe a taxa de fotossíntese (Krizek e Foy, 1987). A seca fisiológica induzida pelo Al restringe a proliferação da raiz, resultando na incapacidade das raízes de absorver a quantidade de água necessária mesmo em ambientes mais úmidos (Krizek e Foy, 1987; Malathi et al., 2000). Geralmente, o Al interfere com a divisão celular nas pontas das raízes e induz à formação de raízes laterais, aumenta a rigidez da parede celular e reduz a replicação de DNA aumentando a rigidez da dupla hélice (Rout et al., 2001). Entretanto, ainda hoje, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância a esse estresse são ainda pouco entendidos (Delhaize e Ryan, 1995). Assim, a identificação dos genes induzidos pelo Al pode ajudar na elucidação de tais mecanismos. O objetivo deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos em ápices de raízes de *Brachiaria decumbens*, espécie reconhecidamente tolerante ao estresse causado pelo alumínio. A escolha da braquiária se deve ao fato de que, além de bem adaptada aos solos ácidos do cerrado brasileiro, essa espécie foi pouco modificada pelo homem e, provavelmente, conserva mais bem preservados seus mecanismos de tolerância ao alumínio.

## Material e Métodos

Sementes de *Brachiaria decumbens* foram germinadas em câmara de crescimento com temperatura entre 25-27°C. Após cinco dias de germinação, as plântulas foram transplantadas para bandejas contendo solução nutritiva pH 4,2, segundo Magnavaca (1982). Após 24 horas de cultivo, metade das plântulas foram transferidas para a solução contendo 1mM de  $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$  e submetidas ao estresse por 1 hora. Após este período, as raízes foram imersas em água destilada e 1 cm dos ápices radiculares cultivados na presença e na ausência do Al foram coletados, sendo diretamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. O RNA mensageiro (RNAm) foi extraído utilizando-se o "Kit Quickprep micro RNAm purification" (Amersham Biosciences) segundo as instruções do fabricante. As bibliotecas de cDNAs necessárias para as reações de subtração foram realizadas utilizando o kit "PCR-Select cDNA Subtraction" (Clontech Laboratories). Para a etapa de subtração, a biblioteca "tester" foi preparada com o mRNA extraído dos ápices radiculares submetidos ao estresse de alumínio e a biblioteca "driver" utilizou o mRNA dos ápices cultivados em solução nutritiva sem alumínio. O processo de hibridização subtrativa e de PCR supressivo foi realizado de acordo com Diatchenko et al. (1996), cujas etapas podem ser sintetizadas na Figura 1.

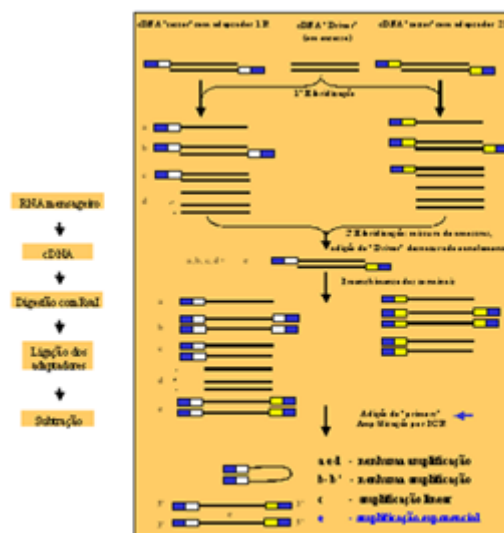


Figura 1 – Fluxograma do protocolo descrito para o "PCR-Select cDNA Subtraction Kit" para obtenção de cDNA preparado por hibridização subtrativa.

Após a segunda amplificação por PCR, os produtos foram clonados utilizando o "Kit TOPO TA Cloning for Sequencing" (Invitrogen) e transformados em *E. coli* competente. O DNA plasmidial das colônias brancas foi extraído pelo método da lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Os clones que apresentaram insertos foram seqüenciados utilizando-se como iniciador M13 direto. As reações de seqüenciamento foram preparadas com o kit "DYEnamic ET Dye Terminator" (Amersham Pharmacia) de acordo com as recomendações dos fabricantes e analisadas no seqüenciador Meba Bace 1000 (Amersham Biosciences). As seqüências obtidas foram comparadas com aquelas já depositadas em bancos de dados públicos "Genbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa Blast X (Altschul et al., 1997).

## Resultados e Discussão

Foram seqüenciados 113 clones obtidos pela biblioteca subtrativa, sendo os principais descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da biblioteca subtrativa referentes aos genes diferentemente expressos em *Brachiaria decumbens* sob estresse de uma hora de alumínio

Descrição no Banco de Dados (GenBank)	Espécie	Número de clones
Proteína não caracterizada		31
Catalase	<i>Campylobacter jejuni</i>	21
SoeE	<i>Mycrococcus nanus</i>	14
Proteína da família MYB	<i>Arabidopsis thaliana</i>	10
Sec14	<i>Oryza sativa</i>	07
Transcriptase reversa	<i>Cicer arietinum</i>	05
Fator de elongação I alfa	<i>Rattus norvegicus</i>	03
UDP-glicose/UDP-manoose desidrogenase	<i>Nitrosomonas europaea</i>	02
Transportador de cálcio ATPase	<i>Ralstonia metallidurans</i>	01
Bomba de efluxo de cálcio	<i>R. metallidurans</i>	01
Citocina desaminase e hidrolases dependentes de metal	<i>R. metallidurans</i>	01
Proteína flagelar	<i>R. metallidurans</i>	01
Família de proteínas de transporte	<i>Pseudomonas putida</i>	01
Metilalonal-CoA mutase	<i>R. metallidurans</i>	01
Peroxidase	<i>O. sativa</i>	01
Transportador de fosfato	<i>Mesorhizobium loti</i>	01
Tirosina fosfatase	<i>Autographa californica</i>	01

Dentre os clones encontrados podem-se destacar alguns deles:

(1) As catalases, proteínas envolvidas em mecanismos de estresses oxidativos (Malecka et al., 2001). (2) As proteínas MYB, fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes responsivos a déficit hídrico em *Arabidopsis* (Urao et al., 1993). A identificação desses fatores neste trabalho sugere que eles podem também estar envolvidos no mecanismo de tolerância ao alumínio em *Brachiaria decumbens*. (3) Proteínas de transporte do sistema fosfatidilinositol/fosfatidilcolina (PITPs), altamente conservadas e envolvidas em eventos de sinalização regulados por lipídeos. O gene SEC14 codifica proteínas de transporte fosfatidilinositol (PtdIns) requeridas na formação de vesículas secretórias em leveduras (Bankaitis et al., 1989). Tal proteína pode também participar de eventos de sinalização relacionados aos mecanismos de tolerância ao alumínio. (4) Várias proteínas ainda não estão caracterizadas. Além disso, alguns clones não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados, indicando que podem ser genes ainda não descritos. Todos esses genes encontrados serão utilizados em análises funcionais para elucidação dos mecanismos de tolerância ao alumínio, podendo ainda ser utilizados como marcadores para identificação de linhagens de milho mais tolerantes ao Al e, conseqüentemente, mais adaptadas aos solos ácidos dos cerrado brasileiro.

Dentre os clones encontrados podem-se destacar alguns deles:

(1) As catalases, proteínas envolvidas em mecanismos de estresses oxidativos (Malecka et al., 2001). (2) As proteínas MYB, fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes responsivos a déficit hídrico em *Arabidopsis* (Urao et al., 1993). A identificação desses fatores neste trabalho sugere que eles podem também estar envolvidos no mecanismo de tolerância ao alumínio em *Brachiaria decumbens*. (3) Proteínas de transporte do sistema fosfatidilinositol/fosfatidilcolina (PITPs), altamente conservadas e envolvidas em eventos de sinalização regulados por lipídeos. O gene SEC14 codifica proteínas de transporte fosfatidilinositol (PtdIns) requeridas na formação de vesículas secretórias em leveduras (Bankaitis et al., 1989). Tal proteína pode também participar de eventos de sinalização relacionados aos mecanismos de tolerância ao alumínio. (4) Várias proteínas ainda não estão caracterizadas. Além disso, alguns clones não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados, indicando que podem ser genes ainda não descritos. Todos esses genes encontrados serão utilizados em análises funcionais para elucidação dos mecanismos de tolerância ao alumínio, podendo ainda ser utilizados como marcadores para identificação de linhagens de milho mais tolerantes ao Al e, conseqüentemente, mais adaptadas aos solos ácidos dos cerrado brasileiro.

## Literatura Citada

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- BANKAITIS, V.A.; MALEHORN, D.E.; EMR, S.D.; AND GREENE, R. The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. **Journal Cell Biology**, v.108, p.1271-1281, 1989.
- DELHAIZE E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p.315-321, 1995.

DIATCHENKO, L.Y.F.C.; LAU, A.P.; CAMPBELL, A.; CHENCHIK, F.; MOQADAN, B.; HUANG, S.; LUKYANOV, K.; LUKYANOV, N.G.; GURSKAYA, E.; SVERDLOV, P.D. SIEBERT. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.6025-6030, 1996.

HORST, W. J., ASHER, C. J., CAKMAK, I., SZWKIEWICA, P., WISSEMEIER, A.H.. Short-term response of soybean roots to aluminium. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.174, 1997.

KOCHIAN L.V. Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.

KRIZEK, D. T., FOY, C. D.,. Water stress: role in differential aluminium tolerance in barley genotypes. **American Soc. Agronomy Abstract**.

MA, J. F.. Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. **Plant Cell Physiology**, v.41, p.383, 2000.

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

MALATHI, N., SARETHY, I. P., PALIWAL, K.,. Effects of aluminium on hydroponically grown *Acacia nilotica* seedlings. **Journal of Plant Biology**, v.28, p.105, 2000

MALECKA A.; JARMUSZKIEWICZ, W.; TOMASZEWSKA, B.. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. **Acta Biochimica Polonica**, v.48, p.687-698, 2001.

MATSUMOTO, H.. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v.200, p.11, 2000.

ROUT, G. R., SAMANTARAY, S., DAS, P. Aluminium toxicity in plants: A review. **Agronomie**, v.21, p.3, 2001

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold spring harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

URAO T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI K.; URAO, S.; SHINOZAKI, K. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. **Plant Cell**, v.11, p.1529-1539,

