



SÍLVIA N. JARDIM, ELIANE A. GOMES, UBIRACI G. P. LANA, EDILSON PAIVA,
CLAUDIA T. GUIMARÃES, ANTÔNIO A. C. PURCINO e NEWTON P. CARNEIRO

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

E-mail: newtonc@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: alumínio, estresse, EST, milho

INTRODUÇÃO

A maior parte do alumínio (Al) existente se encontra na forma de óxidos e aluminossilicatos, sendo ambas prejudiciais para as plantas (Ma & Furukawa, 2003). Nos solos ácidos, que compreendem 58% da terra arável no mundo, o Al é solubilizado e se encontra na forma de um cátion trivalente, Al^{3+} . Em concentrações micromolares, o Al^{3+} inibe o crescimento das raízes, com efeitos subseqüentes na absorção de água e nutrientes, reduzindo a produtividade das culturas (Kochian, 1995). Apesar da toxidez causada pelo Al ser um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância a esse estresse não são completamente compreendidos (Delhaize & Ryan, 1995). Existe uma grande variação na tolerância das plantas ao Al sugerindo que as espécies e cultivares possuem mecanismos diferentes para a detoxificação do Al. No caso do milho, estudos genéticos indicam que poucos genes parecem estar envolvidos na tolerância ao Al. Cultivares geneticamente adaptados a solos ácidos podem oferecer uma solução ambiental compatível, contribuindo para um sistema agrícola sustentável. Esta abordagem é particularmente interessante para o milho, em que há germoplasma tolerante ao Al disponível para seleção e estudos genéticos (Magnavaca et al., 1987). Devido à grande disponibilidade de informações no GenBank, uma estratégia que pode ajudar a conhecer melhor os mecanismos moleculares inerentes à tolerância a esse estresse é o seqüenciamento sistemático de genes expressos em raiz de genótipos tolerantes na presença do estresse. Com essa estratégia pode-se determinar um perfil qualitativo e quantitativo dos genes expressos e com isso inferir sobre níveis de proteínas relacionados ou não com o estresse de Al. O objetivo deste trabalho foi a identificação de genes expressos em ápices radiculares submetidos à toxidez de Al, em dois genótipos de milho tolerantes, categorizando-os em termos funcionais com base nas informações disponíveis no GenBank.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de milho das linhagens tolerantes ao estresse de Al, L3 e Cateto, foram germinadas por três dias, no escuro, em papel toalha umedecido e transferidas para solução nutritiva completa, pH 4.2, sem Al (Magnavaca, 1982). Após 15 dias de cultivo, as plantas foram expostas à mesma solução nutritiva contendo 222 μM de Al na forma de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ por 4 horas e, em seguida, as raízes foram lavadas em água destilada, levemente secas com papel toalha, coletadas em N_2 líquido e imediatamente usadas para extração de RNA. Os RNAs foram isolados de pontas de raízes de 0,5 cm de comprimento, utilizando o método do trizol (Sambrook et al., 1989) e os RNAs mensageiros (mRNA) foram purificados em coluna de oligo dT (Invitrogen). As bibliotecas de cDNA foram preparadas a partir de uma mistura de mRNA das duas linhagens utilizando o kit "Smart cDNA Library Construction" (Invitrogen). A viabilidade das bibliotecas de cDNA foi baseada no número de fagos por micrograma de cDNA, na porcentagem de recombinantes (IPTG/X-Gal), na digestão dos plasmídeos para confirmação da presença do inserto e na redundância de clones determinada por meio do seqüenciamento de aproximadamente 200 clones. Os clones da biblioteca de cDNA foram estocados em placas de 96 poços, em glicerol 10%, a -80°C . As preparações de DNA foram feitas pelo método de lise alcalina (Sambrook et al. 1989) e o DNA obtido foi quantificado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. O seqüenciamento das extremidades 5' dos insertos foi realizado com o kit "BigDye Terminator Cycle Sequencing" (Applied Biosystems) no seqüenciador capilar DNA ABI3100 (Applied Biosystems). As seqüências de DNA foram analisadas pelo programa BlastN (Altschul et al., 1997) e comparadas com o GenBank Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A integridade do mRNA foi confirmada em gel de agarose, utilizando-se as bandas 18S e 28S de RNA ribossômico como padrões (Figura 1). A biblioteca de cDNAs, cujo título final foi de 10^6 fagos/mL, foi confeccionada com 1 μg de mRNA. Para determinar o número de fagos recombinantes foi utilizada *E. coli* BM25.8 que contém um sistema de conversão de um clone λ Triplex2 em um plasmídeo pTriplex2 por uma excisão e circularização de um plasmídeo completo a partir do fago recombinante. Foram obtidos, aproximadamente, 75% de clones recombinantes, cujos insertos variaram de 0,5 a 1,6 kb.

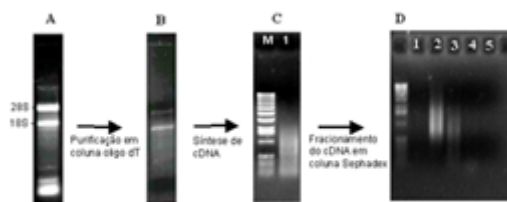


FIGURA 1. Gel de agarose do RNA total (A), do mRNA (B), do cDNA (C) e do cDNA fracionado em coluna de Sephadex (D). Os números representam frações de cDNA após fracionamento.

O seqüenciamento da extremidade 5' gerou seqüências com tamanho de 350 pares de bases em média, representando as regiões mais conservadas dos genes. Foram seqüenciados 2.250 clones. A região 3' não foi seqüenciada devido à presença da cauda poli-A que dificulta o processo de seqüenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas no GenBank usando o programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), considerando como limite o *e-value* igual ou menor a e^{-10} . Dentre os clones seqüenciados, 56% apresentaram similaridade com seqüências de milho, 21% de arroz e 11% de *Arabidopsis thaliana*, sendo que 431 clones (19,3%) não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência depositada no GenBank (Figura 2).

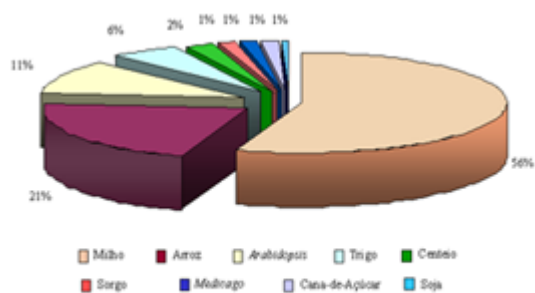
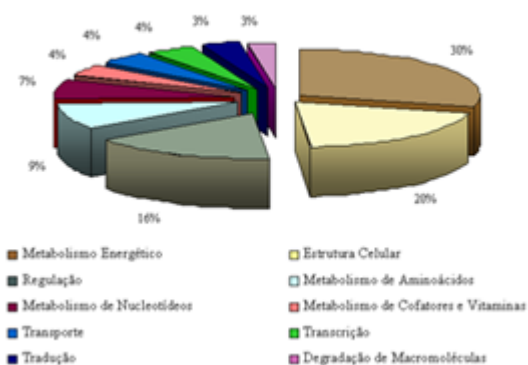


FIGURA 2. Porcentagem dos clones de ESTs de milho expressos sob estresse de alumínio, que apresentaram homologia com diferentes espécies vegetais.

FIGURA 2. Porcentagem dos clones de ESTs de milho expressos sob estresse de alumínio, que apresentaram homologia com diferentes espécies vegetais.



0

FIGURA 3. Categorização funcional dos clones de ESTs de milho expressos sob estresse de alumínio.

CONCLUSÃO

O seqüenciamento de genes expressos em raízes de milho sob estresse de Al indicou que mecanismos de proteção ao estresse oxidativo, síntese de ácidos orgânicos, além de genes envolvidos na síntese da parede celular e na organização do citoesqueleto, podem estar envolvidos na tolerância ao Al. Vários genes induzidos sob outros tipos de estresses abióticos foram também identificados no presente estudo. No entanto, análises mais avançadas referentes à expressão gênica dos referidos clones são necessárias para a elucidação dos reais mecanismos envolvidos na tolerância ao Al em milho.

LITERATURA CITADA

- DELHAIZE, E.; RYAN, P. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p.115-121, 1995.
- KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.46, p.237-260, 1995.

MA, J.F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external al detoxification in higher plants: a Minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p.46-51, 2003.

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

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.196. p.788-795, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.



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