

# Prospecção e caracterização de genes de importância agrônômica nas culturas de milho e sorgo

Antonio A. C. Purcino<sup>1</sup>, Newton P. Carneiro<sup>1</sup>, Vera M. 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@cnpmc.embrapa.br, <sup>2</sup>Bolsista DTI PADCT/CNPq, <sup>3</sup>Bolsista DTI do CNPq, <sup>4</sup>Bolsista Recém-doutor da FAPEMIG.

## Caracterização do problema

A geração de novas tecnologias que permitam o desenvolvimento de genótipos de milho mais tolerantes ao estresse causado pela toxidez de alumínio (Al) e mais adaptados aos solos ácidos pode causar um grande impacto econômico no desenvolvimento do agronegócio da região dos cerrados brasileiros. Somente no Brasil Central, uma região que já possui razoável infra estrutura viária e está relativamente perto dos grandes centros de consumo, os cerrados ocupam uma área de 175 milhões de ha, dos quais, atualmente, apenas 15 milhões estão sendo utilizados para a agricultura. Nestes 15 milhões de ha ocupados com lavouras, o milho aparece com destaque, pois é cultivado em aproximadamente 4,5 milhões de ha. Como o milho é uma cultura bastante sensível à toxidez de Al, sua expansão na região do cerrado está limitada às áreas em que o pH do solo foi corrigido e cultivadas nos primeiros 2-3 anos com soja ou arroz, as quais são lavouras mais adaptadas a este tipo de estresse. Deve-se ressaltar ainda, que o milho possui baixa variabilidade genética para este caráter e poucos são os híbridos disponíveis comercialmente que apresentam alguma tolerância ao estresse causado por este mineral.

O fato que o alumínio prejudica o desenvolvimento das plantas já foi reconhecido a mais de 80 anos. Entretanto, ainda hoje, e apesar de que a toxidez causada por este mineral seja um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância a este estresse são ainda pouco entendidos (Delhaize e Ryan, 1995).

O ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica do Al e o sintoma mais visível deste estresse é a inibição do crescimento do sistema radicular (Ryan et al., 1993). Em milho, a parte distal da zona de transição no ápice das raízes, onde as células estão entrando em fase de alongamento, é o principal sítio da ação tóxica do alumínio (Sivaguru e Horst, 1998). Evidências recentes sugerem que a base da diferenciação genotípica para tolerância ao Al está correlacionada com a menor inibição do crescimento radicular, o menor acúmulo de Al e a formação de calose na zona distal de transição (ZDT) localizada 1-2 mm acima do ápice radicular. Aparentemente, em genótipos sensíveis, o Al inibe o transporte basipetal de auxinas entre a ZDT e a zona de alongamento (ZE, com 2-3 mm de comprimento) imediatamente acima, causando severa inibição do desenvolvimento radicular (Kollmeir et al., 2000).

Este projeto baseia-se na hipótese de que durante o processo evolutivo, diferentes espécies vegetais desenvolveram diferentes mecanismos de adaptação à toxidez de Al, e tem como objetivo principal, isolar e caracterizar o maior número possível de genes que controlam os mecanismos de tolerância ao Al nas culturas de milho e sorgo.

## Materiais e Métodos

A prospeção dos genes induzidos pelo Al foi realizada no ápice das raízes das linhagens L3 e Cateto 237 de milho e na linhagem SC 283 de sorgo. As sementes de cada genótipo foram germinadas no escuro em papel toalha e, posteriormente, transferidas para a solução nutritiva de Magnavaca (1982), pH 4,2, sem Al. Depois de aclimatadas por aproximadamente 24 h nesta solução nutritiva as plantas foram expostas ao estresse causado pelo nível crítico de Al estabelecido para cada genótipo por períodos de 1, 4 e 24 horas.

Para identificação dos genes induzidos pelo Al utilizou-se as técnicas de hibridação subtrativa seguida por PCR supressivo, como descrito por Desai et al., 2000. cDNAs "testers" foram preparados a partir das plantas que foram tratadas com Al, enquanto os cDNA "drivers" foram preparados de plantas não tratadas com Al. O cDNA "tester" foi inicialmente ligado aos adaptadores 1 e 2R e a seguir individualmente hibridado com o cDNA "driver". A seguir, numa segunda hibridação, os produtos da primeira hibridação são misturados na presença do cDNA "driver" desnaturado. Após preenchimento dos terminais pela DNA polimerase, essa população de moléculas foi amplificada por PCR, visando o aumento das seqüências expressas diferencialmente (no nosso experimento, visando a amplificação das seqüências induzidas pelo Al). Uma segunda amplificação utilizando "primers" internos foi realizada para aumentar a população dos segmentos expressos diferencialmente, consequentemente, diminuindo o background. Estes produtos de PCR foram clonados no vetor pT-Adv e transformados em *E. coli* TOP 10 F<sup>-</sup>. 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

Trabalhos prévios com as linhagens Cateto 237 e L3 mostraram que elas diferem em seus mecanismos de tolerância ao estresse de Al. 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, supõe-se que estas duas linhagens possuem mecanismos distintos de tolerância ao complexo de estresses observados em solos ácidos.

As seqüências obtidas foram neste trabalho 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. É interessante observar, que apesar de a excreção de ácidos orgânicos ser um dos prováveis mecanismos de imobilização do Al na rizosfera destas duas linhagens, não foi possível isolar neste trabalho, nenhum gene relacionado a este tipo de mecanismo. Aparentemente, estes dados corroboram a hipótese de que o estresse de Al não induz a um aumento na síntese destes ácidos

orgânicos, mas permite que haja um aumento na sua excreção, através da indução de genes que controlam a permeabilidade das membranas.

Na linhagem L3 foi encontrado, após 4 horas de estresse pelo Al, observou-se o aparecimento de um gene transportador de fósforo, o que provavelmente contribui para uma maior adaptação desta linhagem aos solos ácidos, já que a deficiência deste mineral é bastante comum nestes solos. Ainda nesta linhagem foi encontrada um gene que codifica para uma proteína capaz de acumular grandes quantidades de  $Ca^{2+}$ , o qual pode tornar-se disponível em períodos de estresse das plantas.

Na linhagem SC 283 o estresse de Al por 4 e 1 h induziu a presença de 6 e 29 genes respectivamente. Destes 35 genes encontrados no sorgo, apenas 2 foram também observados nos experimentos com as duas linhagens de milho. Estes resultados sugerem, portanto, que os mecanismos de tolerância ao Al nestas culturas são bastante distintos. Deve-se salientar entretanto, que destes 35 genes induzidos pelo Al no sorgo, 16 mostraram alta homologia com seqüências de milho que não apareceram nas bibliotecas de subtração do milho.

## Referencias

Desai, S., J. Hill, S. Trelogan, L. Diatchenko, P. Siebert. 2000. Identification of differentially expressed genes by suppressive subtractive hybridization. IN: S. Hunt, F. Liversey (eds) Functional Genomics - Practical Approach, Oxford Press, New York, pp. 81-112.

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.