

## Prospecção De Genes Induzidos Por Alumínio Em Ápices De Raízes De Milho

Antônio Álvaro Corsetti PURCINO, Newton Portilho CARNEIRO, Vera Maria Carvalho ALVES, Claudia Teixeira GUIMARÃES, Sidney Netto PARENTONI, Edilson PAIVA, Daniela Duarte Alves PEREIRA, Anne Cybelle PINTO, Eliane Aparecida GOMES, Silvia Neto JARDIM

Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35.701-970 Sete Lagoas, MG.  
[corsetti@cnpmc.embrapa.br](mailto:corsetti@cnpmc.embrapa.br)

### Introdução

O fato que o alumínio prejudica o desenvolvimento das plantas já foi reconhecido a mais de 70 anos. Entretanto, ainda hoje, e apesar de que a toxidez causada por esse mineral seja um dos principais fatores limitantes da produtividade agrícola em solos ácidos, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância a esse estresse são ainda pouco entendidos. A parte distal da zona de transição no ápice das raízes, onde as células estão entrando em fase de alongamento, é o sítio primária da ação tóxica do alumínio (Sivaguru e Horst, 1998) e o sintoma mais visível deste estresse é a inibição do crescimento do sistema radicular. Plantas submetidas ao estresse de Al geralmente apresentam múltiplas deficiências minerais que aparentemente ocorrem em função do Al induzir a deposição de calose nos canais plasmodesmáticos, inibindo fisicamente o transporte simplástico entre células.

Snowden et al (1993) e Richards et al. (1994) isolaram sete cDNAs que codificam proteínas induzidas por Al em raízes de um cultivar sensível de trigo. Esses genes, denominados *wali* (wheat aluminum induced) são geralmente induzidos 24 a 96 horas depois que as raízes são expostas ao Al e mostraram homologia com inibidores de proteinase (*wali3*, *wali5* e *wali6*), com a enzima fenil-amônia liase (*wali4*) e com proteínas similares às metalotioneínas (*wali1*). Estudos mais avançados sobre tolerância ao estresse de Al foram realizados com trigo, mas como outras espécies vegetais evoluíram em nichos ecológicos diferentes, estas devem ter desenvolvido outros mecanismos de adaptação a esse tipo de estresse. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar genes induzidos pelo Al no ápice da raiz da linhagem de milho Cateto AL 237, considerada como altamente tolerante a toxidez do Al.

### Metodologia

Ápices de raízes com 1 cm de comprimento foram obtidos após 4 dias de germinação e cultivo por 24 h em solução nutritiva completa, na presença e ausência de 222  $\mu$ mol Al. A identificação dos genes especificamente induzidos pelo Al foi feita utilizando-se as técnicas de hibridização subtrativa e PCR supressivo como descrito para os kits produzidos pela Clontech Laboratories ([www.clontech.com](http://www.clontech.com)) (Cidade, estado, país). Os produtos da segunda reação de PCR foram clonados no vetor pT-Adv e a biblioteca de cDNAs obtida foi escrutinada com sondas subtraídas e não subtraídas produzidas pelas técnicas de subtração direta e subtração

reversa, marcadas com dUTP-digoxigenina (Figura 1). Clones diferencialmente induzidos pelo AI foram sequenciados e comparados com as seqüências depositadas no Genebank, utilizando o programa BLAST disponível no endereço [www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/).

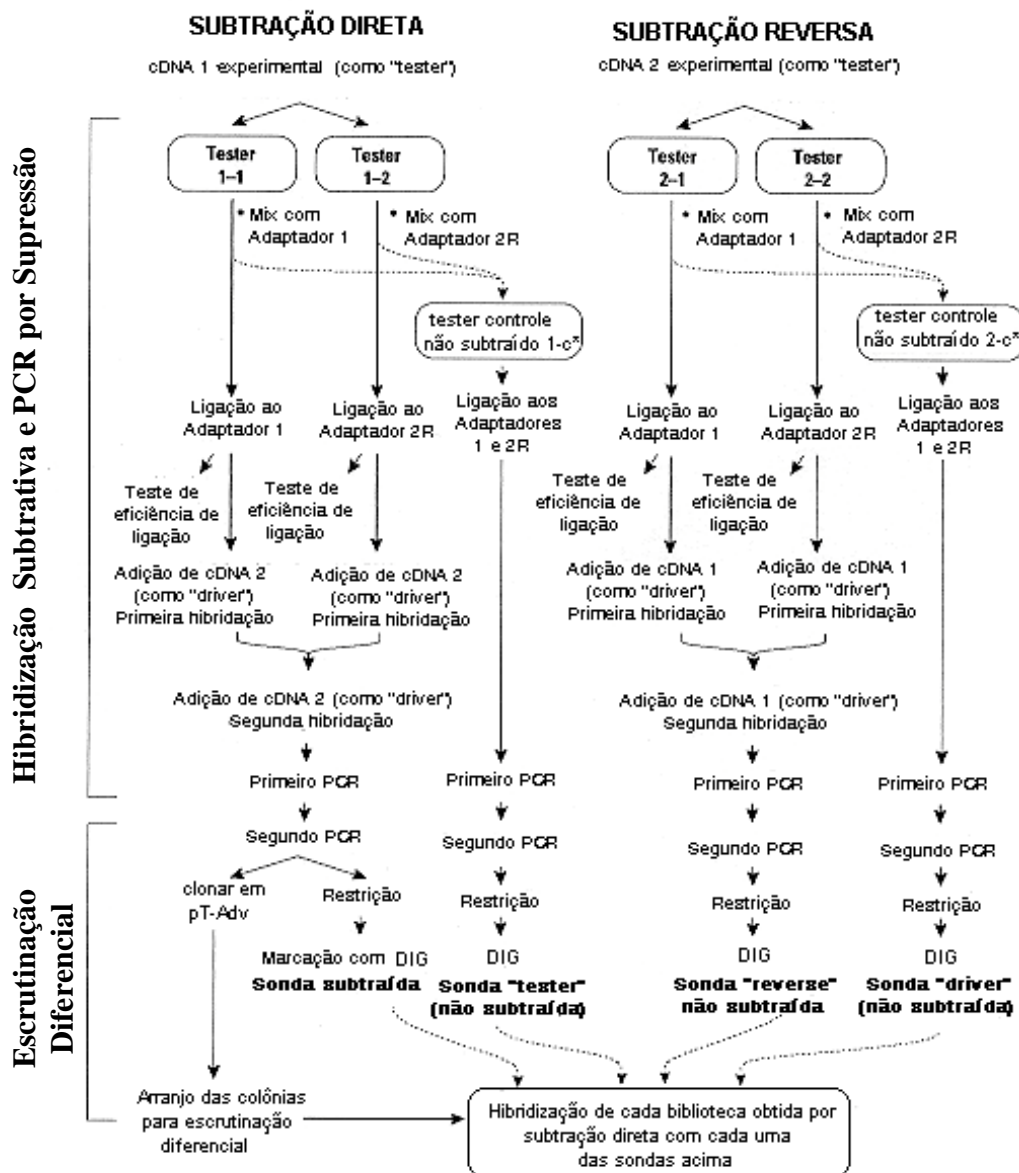


Figura 1 – Fluxograma do esquema experimental para obtenção das bibliotecas de subtração direta e subtração reversa e das sondas subtraídas e não subtraídas.

Na Figura 1, a subtração direta foi feita utilizando-se a população de cDNAs obtida de ápices radiculares tratados com AI como cDNA “tester” e a população de cDNAs obtida de ápices radiculares não tratados com AI como cDNA “driver”. Por outro lado, na subtração reversa, como o próprio nome sugere, a população de cDNAs não tratados com AI é que foi utilizada como cDNA “tester” e a população de cDNAs tratados com AI, como cDNA “driver”.

## Resultados

Os resultados das comparações das seqüências dos clones obtidos com o Genbank utilizando o BLAST estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Resultado das análises comparativas no Genbank dos clones diferencialmente obtidos nos ensaios de hibridização subtrativa e PCR supressivo.

Descrição	Código	Nº de clones	% de clones
rRNA	rRNA	20	52,63
Vetor	VET	7	18,42
Sem homologia BLAST	SHB	5	13,16
Metionina Sintase de Milho	MSM	1	2,63
mRNA de hemoglobina de milho	mRNA-Mil	1	2,63
mRNA de Viviparo3	mRNA-VIP	1	2,63
<i>P. sativum</i> – proteína associada com senescência	PSS	1	2,63
Invertase de parede celular de Milho	INV	1	2,63
Ascorbato peroxidase de arroz	APX	1	2,63
Total		38	100,00

## Conclusões

Alta homologia foi encontrada com os genes da ascorbato peroxidase (APX) de arroz, de uma proteína associada à senescência em *P. sativum*, da metionina sintase (MSM), do Vivíparo 3 (VIP3), da hemoglobina (mRNA-Mil) e de uma invertase de parede celular de milho. Os genes da AP, MSM, VIP3 e mRNA-Mil estão envolvidos em mecanismos de proteção ao estresse oxidativo, sugerindo que na linhagem Cateto Al 237, o estresse oxidativo é um importante componente da reação da planta à intoxicação com Al. Cinco clones não mostraram homologia com seqüências no Genbank, indicando que outros mecanismos podem fazer parte do sistema de defesa da planta contra este tipo de estresse.

## Referencias Bibliográficas

- Richards K.D., Snowden K.C., Gardner R.C. 1994. *wali 6 and wali7*: genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 105: 1455-1456.
- Sivagruru M. e Horst W.J. 1998. The distal part of the transitional zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize, *Plant Physiol.* 163: 155-163
- Snowden K.C., Gardner R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiol.* 107: 855-861.