



UBIRACI G.P.LANA<sup>1</sup>, NEWTON P. CARNEIRO<sup>1</sup> e ISABEL R.P.SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 Sete Lagoas, MG – CEP 35701-970  
E-mail: [newtonc@cnpms.embrapa.br](mailto:newtonc@cnpms.embrapa.br)

Palavras-chave: *Zea mays* L., hibridização subtrativa, *Maize dwarf mosaic virus*.

## **INTRODUÇÃO**

O Mosaico Comum do Milho, encontra-se atualmente distribuída em regiões temperadas e tropicais com ocorrência em nível mundial (Kuntze et al., 1997; Almeida et al., 2001; Waquil et al., 1996). Nas condições brasileiras, a importância econômica do Mosaico intensificou-se com a expansão da área cultivada com o milho safrinha (plantado entre fevereiro/março) e com a adoção da irrigação, que reduziu a sazonalidade do plantio e superpôs ciclos da planta no campo, culminando com a perpetuação de pragas e patógenos no agroecossistema (Waquil et al., 1996). Além disso, o emprego de híbridos de milho susceptíveis (Almeida, 1998, 2001; Waquil et al., 1996) e a presença de plantas hospedeiras têm contribuído para maior incidência da doença, culminando em sérios prejuízos causados à produção. Como medidas de controle para o Mosaico são mencionadas a eliminação de fontes de inóculo, proporcionadas pela presença de plantas daninhas gramíneas apresentando sintomas de mosaico nas áreas destinadas ao plantio do milho e adequação da época de plantio para o mês de outubro (Almeida et al. 2000; Almeida, 1998), sendo que a medida mais importante seria a utilização de cultivares resistentes. A identificação de genes conferindo resistência ao Mosaico é de importância para um programa de melhoramento na transferência destes genes para genótipos-elites susceptíveis. Dentre as técnicas empregadas, que permitem a identificação de fragmentos gênicos diferencialmente expressos em genótipos contrastantes quanto a resistência a doenças, tem-se a hibridização subtrativa. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi prospectar genes diferencialmente expressos em linhagem de milho tropical, L18, resistente ao Mosaico Comum, empregando-se a técnica de hibridização subtrativa.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Populações de mapeamento

Linhagens de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, contrastantes quanto a resistência ao Mosaico Comum do Milho, L18-resistente e L19-susceptível foram utilizadas em cruzamentos para a obtenção de populações estruturadas de mapeamento. As famílias F<sub>3</sub> foram inoculadas com o vírus do Mosaico Comum no estádio de 3-4 folhas. Trinta dias após inoculação as famílias sintomáticas e as que não apresentavam sintomas tiveram suas folhas coletadas para a formação dos *bulks*, respectivamente, susceptível e resistente.

#### Extração do RNA mensageiro (RNAm)

O RNAm para produção da biblioteca de cDNA foi extraído dos *bulks*, empregando-se o *Kit Quickprep micro RNAm purification* (Amersham Biosciences, Piscataway, EUA).

#### Identificação dos genes diferencialmente expressos em plantas resistentes ao Mosaico Comum do milho

A identificação dos genes diferencialmente expressos foi por meio da hibridação subtrativa e PCR por supressão (Diatchenko et al., 1996). Para obtenção da biblioteca utilizou-se o *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, EUA) conforme instruções do fabricante, destacando a seguir as principais etapas.

#### Síntese dos cDNAs *tester* e *driver* e Digestão dos cDNAs com enzima de restrição *Rsa*

##### I

Uma biblioteca *tester* foi preparada a partir da população de RNAm do *bulk* resistente ao Mosaico Comum. A biblioteca, *driver*, foi preparada a partir da população de RNAm do *bulk* susceptível. Os cDNAs *tester* e *driver* foram digeridos separadamente para a obtenção de fragmentos curtos e de final abrupto.

#### Ligação dos adaptadores ao cDNA "tester" digerido com *Rsa* I

A população *tester* foi subdividida em duas alíquotas, sendo que uma recebeu o adaptador 1 e a outra recebeu o adaptador 2R e o cDNA *driver* não recebeu adaptadores.

#### Hibridizações

Foram feitas duas reações de amplificação, sendo a primeira um PCR por supressão, com o intuito de obter somente as seqüências diferencialmente expressas amplificadas exponencialmente. Já a segunda amplificação foi realizada com o objetivo de reduzir o "background" e enriquecer ainda mais as seqüências diferencialmente expressas.

#### Clonagem dos produtos da segunda amplificação de PCR, extração e digestão dos plasmídeos (clones)

Os produtos da segunda amplificação por PCR, foram clonados no vetor TOPO TA 2.1, utilizando-se o *Kit TOPO TA Cloning for Sequencing* (Invitrogen). Após transformação bacteriana o produto foi plaqueado em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina, onde haviam sido distribuídos 5 µL de IPTG 0,8 M e 50 µL de X-Gal 10 mg/mL. As colônias brancas isoladas foram inoculadas em meio LB contendo 200 µg/mL de ampicilina. Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o método de lise alcalina descrito por Sambrook et al. (1989). Fez-se a digestão dos clones com a enzima de restrição *Eco* RI para confirmar a presença, o tamanho dos insertos e a eficiência da digestão.

#### Reações de seqüenciamento dos clones

Como iniciadores foram utilizados M13 R e F e as reações de seqüenciamento realizadas com o *kit Big Dye Terminator* v. 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e analisadas no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems).

#### Análise dos clones

Após a retirada do vetor, as seqüências "forward e reverse" de cada clone, foram alinhadas, utilizando-se o programa CAP3 (<http://bio.ifom-firc.it/ASSEMBLY/assemble.html>), obtendo-se uma seqüência consenso para cada clone. Comparou-se então com as seqüências depositadas no banco de dados "Genbank" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando-se o programa Blast N.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O produto da segunda amplificação da hibridização subtrativa, cujas bibliotecas de cDNA foram obtidas a partir dos *bulks* das famílias F<sub>3</sub> resistente e susceptíveis ao Mosaico Comum, pode ser visualizado na Figura 1. Posteriormente, este produto foi ligado ao vetor TOPO TA 2.1 e clonado em *E. coli* DH5 $\alpha$ . As colônias brancas foram inoculadas em meio de cultura LB com ampicilina para extração plasmidial. Para confirmação da presença de inserto, os plasmídeos obtidos foram digeridos, sendo selecionados 51 clones (Figura 2). Todos estes clones foram seqüenciados e as seqüências consenso comparadas com as do banco de dados, *GenBank* (Tabela 1). Dentre os clones encontrados, destaca-se a glioxalase I (acesso nº NM\_006708.1). As glioxalases, catalisam a conversão de 2-oxaldeídos em ácido 2-hidroxicarboxílico, utilizando como substrato a coenzima glutationa. Glioxalases em sistemas animais e microbianos têm sido descritas a mais de 80 anos, entretanto, há carência de estudos sobre a fisiologia deste sistema. O sistema das glioxalases tem sido proposto atuar na proteção contra o oxaldeído citotóxico, regulação da divisão e proliferação celular, montagem dos microtúbulos, mobilização vesicular, crescimento de tumores e complicações clínicas associadas a várias doenças humanas, como por exemplo *Diabetes mellitus*. As glioxalases I e II têm sido purificadas e caracterizadas em poucas espécies de plantas (Deswal *et al.* 1993). Tratamentos que estimulam o crescimento celular, incluindo hormônios e luz, aumentam a atividade da glioxalase I. Por outro lado, a inibição do crescimento celular resulta na redução do nível desta enzima (Paulus *et al.*, 1993) Entretanto, uma relação de causa entre a atividade da glioxalase I e o rápido crescimento celular ainda não é bem entendida. Em tomate, *Lycopersicon esculentum*, a glyoxalase I é hiper-regulada em resposta a estresses salino, osmótico e fitohormonal (Espartero *et al.*, 1995). Em *Brassica juncea*, essa proteína é também hiper-regulada em resposta a estresses salino e osmótico, além dos causados por metais pesados como o Zinco (Veena *et al.*, 1999). Assim, a glioxalase I pode ser regulada por estresses abióticos. A identificação da glioxalase I em resposta ao Mosaico Comum do milho sugere que esta proteína estaria também envolvida em estresses bióticos. Outro clone, MEP 50 (acesso BC016946.1), foi descrito recentemente como uma proteína componente dos metilossomos e rica em domínios WD (Licciardo *et al.*, 2003). Esses domínios, também conhecidos como Trp-Asp ou WD40 são encontrados em várias proteínas de eucariotos, estando envolvidas numa grande variedade de processos celulares, como mobilização e interação de proteínas (Nocker e Ludwing, 2003). A MEP 50 funciona como um mediador para a interação de múltiplos substratos com o metilossomo, um complexo protéico envolvido na montagem de snRNP (Friesen *et al.*, 2002). Em plantas, tal proteína não foi ainda descrita, podendo estar envolvida em respostas de defesa da planta. O clone CL615-1 (acesso nº AY110277.1) foi também encontrado no projeto de mapeamento do genoma do milho (Maize Mapping Project University of Missouri, Columbia, MO 65211, EUA) e sua função é ainda desconhecida. Foram identificados clones com alta similaridade com o gene do RNA ribossomal 25S do milho (acesso nº ZMA309824). Quatro clones não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados, indicando que podem ser genes ainda não descritos. Todos esses

clones obtidos serão utilizados em análises de expressão gênica fornecendo informações importantes para a elucidação dos mecanismos de resistência ao Mosaico Comum do Milho.

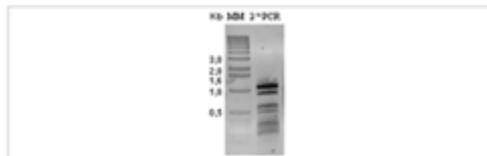


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da segunda amplificação da hibridização subtrativa.

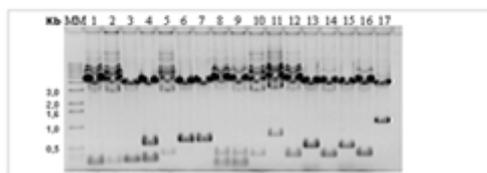


FIGURA 2. Perfil de alguns clones digeridos com a enzima Eco RI.

TABELA 1. Resultado da biblioteca subtrativa referente aos genes diferencialmente expressos em plantas resistentes ao Mosaico Comum do Milho, encontrados através da similaridade em Banco de Dados (GenBank).

Descrição no Banco de Dados (GenBank)	Número de Clones	Tamanho da sequência (pb)	e-value
H. sapota glyoxalase I	07	241	e-105
H. sapota MEP50	03	516	0
H. sapota chromosome I	06	369	e-174
Zea mays CL615-1	04	621	e-156
Zea mays 25S rRNA	04	347	e-156
Bacteriophage phi-X174	03	374	e-104
Sem Similaridade			
A	05	312	
B	03	530	
C	02	340	
D	01	740	
Vetor	06		
Sequências ruins	02		
TOTAL	51		

## LITERATURA CITADA

- Almeida ACL. (1998) Detecção, caracterização e aspectos epidemiológicos do complexo viral do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.). **Tese de mestrado**, UnB – Brasília, DF. 83p.
- Almeida ACL, Oliveira E, Resende R. Fatores relacionados à incidência e disseminação do vírus do mosaico comum do milho. *Fitopatol bras.* 26 (4): 766-769, 2001.
- CLONTECH Laboratories, Inc. **CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual**, 1997.
- Deswal, R.; Chakaravarty, T.N.; Sopory, S.K. The glyoxalase system in higher plants: Regulation in growth and differentiation. **Biochem. Soc Trans.** v.21, p. 527-530, 1993.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 6025-6030, 1996.
- Espartero, J.; Sanchez-Aguayo I.; Pardo, J.M. Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. **Plant Mol. Biol.** v.29, p. 1223-1233, 1995.
- Friesen, W.J.; Wyce, A.; Paushkin, S.; Abel, L.; Rappsilber, J.; Mann, M.; Dreyfuss, G. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. **J. Biol. Chem.**, v.277, p. 8243-8247, 2002.
- Kuntze L, Fuchs E, Grüntzig M, Schulz B, Klein D, Melchinger AE. 1997. Resistance of early-maturing European maize germplasm to sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV). **Plant Breeding** 116, 499-501.

Licciardo, P.; Amente, S.; Ruggiero, L.; Monti, M.; Pucci, P.; Lania, L.; Majello, B. The FCP1 phosphatase interacts with RNA polymerase II and with MEP50 a component of the methylosome complex involved in the assembly of snRNP. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p.999-1005, 2003.

Nocker, S.; Ludwing, P. The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function. **BMC Genomics**, v.4, p. 50, 2003.

Paulus C.; Kollner B.; Jacobsen H.J. Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension. **Planta** v.189, p. 561-566, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2ed. Cold spring harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory. s.n.p. 1989.

Veena; Reddy, S.V.; Sopory, S.K. Glyoxalase I from *Brassica juncea* : molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. **The Plant Journal**. v.17, p. 385, 1999.

WAQUIL, J.M., OLIVEIRA, E., PINTO, N.F.J.A., FERNANDES, F.F., CORRÊA, L.A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, 1996.



---

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

---