

Caracterização da Família Gênica das Metalotioneínas em Milho

GRACIELLE T. C. P. COELHO^{1,2}, ANDRÉA A. CARNEIRO², CLÁUDIA T. GUIMARÃES², LUCIANO V. PAIVA¹, ROSÂNGELA L. BRANDÃO^{1,2}, CAROLINE P. PETRILLO^{1,2}, ANTÔNIO A. C. PURCINO², EDILSON PAIVA², FELIPE R. DA SILVA³, FABIANA CONSOLO⁴ e NEWTON P. CARNEIRO²

Palavras-chave: metalotioneínas, milho, famílias gênicas, bibliotecas.

¹ Universidade Federal de Lavras, ² Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – CP 151; newtonc@cnpmc.embrapa.br, ³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia ⁴ Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas Vieytes 3103 - (B7602FCK) Mar del Plata - Argentina

Introdução

As plantas estão sujeitas a uma grande variedade de estresses abióticos durante o seu ciclo de vida, requerendo a expressão de condições adaptativas variadas para sobreviver. Estímulos a esses estresses como luz, temperatura, água, anaerobiose, metais pesados e disponibilidade de nutrientes são regulados por várias mudanças metabólicas, sendo algumas controladas ao nível de expressão gênica. A toxidez mineral é um estresse abiótico importante, principalmente nos solos brasileiros.

Algumas plantas apresentam a capacidade de sobreviver em ambientes ricos em metais, cujas concentrações são normalmente tóxicas. Diferentes formas de tolerância podem indicar a presença de diferentes genes relacionados às rotas de defesa das plantas a estes estresses. Diversos genes, supostamente envolvidos na tolerância à toxidez de metais, já foram clonados e inseridos no genoma de plantas transgênicas (Eapen e D'Souza, 2005), mas pouco ainda se sabe sobre seus mecanismos de ação.

As metalotioneínas (MTs) são proteínas ricas em cisteína e que apresentam alta afinidade de ligação a metais (Hall, 2002), sendo citadas por diversos autores como associadas com a tolerância a metais pesados (Framond, 1991; Charbonnel-Campaa *et al.*, 2000; Hall, 2002; Guo *et al.*, 2003; Mir *et al.*, 2004; Eapen e D'Souza, 2005). Robinson *et al.* (1993) compararam diferentes seqüências de MT e as separaram em dois grupos distintos quanto a localização dos resíduos de cisteína. Estes mesmos autores sugeriram que a disposição das cisteínas na proteína forma locais que favorecem a ligação de metais. Entretanto, outros autores afirmam a existência de quatro diferentes tipos de MT, de acordo com a disposição dos resíduos de cisteína presentes nos dois domínios da proteína (Figueira *et al.*, 2001).

Genes que codificam para MTs têm sido encontrados em bibliotecas subtrativas de diferentes estresses abióticos por vários grupos de pesquisas, incluindo o da Embrapa Milho e Sorgo, que tem identificado ESTs diferencialmente expressas em diferentes gramíneas submetidas a estresses de alumínio, encharcamento, seca, ataque de insetos e de patógenos. A identificação de genes que codificam para proteínas capazes de se ligarem a metais que pudessem ser aplicados em grande escala tanto na indústria quanto na agricultura seria de grande interesse, uma vez que, problemas de toxidez causada por metais no solo estão se tornando cada vez mais comuns. Segundo Eapen e D'Souza (2005), a biorremediação é uma alternativa tecnológica promissora para remover poluentes tanto dos solos quanto das águas, e ressaltam ainda que metalotioneínas estão sendo estudadas para o sequestro de metais. Portanto,

estudos de caracterização de genes que codificam para MT poderiam trazer grandes benefícios para a agricultura e o meio ambiente. Segundo Callahan *et al.* (2006), plantas fitorremediadoras poderiam ser utilizadas para cultivo em solos contaminados com excesso de metais. Tais plantas teriam a aplicabilidade tanto para aumentar a produtividade de áreas marginais quanto na detoxificação do solo para receber cultivares não tolerantes.

Objetivo

Para um melhor conhecimento acerca desta família de genes em milho, realizou-se uma busca sobre as seqüências de metalotioneínas já descritas em gramíneas e a comparação com os resultados obtidos nas bibliotecas subtrativas sob estresses abióticos realizadas na Embrapa Milho e Sorgo. Esses dados serão importantes em uma segunda etapa para estudos mais aprofundados de expressão dos membros da família de MTs em milho e sua subsequente utilização na agricultura.

Material e Métodos

Inicialmente foi feita uma busca por seqüências de metalotioneínas nos bancos de dados do NCBI (www.ncbi.nih.gov), do TIGR (www.tigr.org) e da EMBRAPA (valine.cenargen.embrapa.br). As seqüências depositadas pela Embrapa foram obtidas de bibliotecas subtrativas construídas sob diferentes estresses em arroz, milho, trigo, cevada e braquiária.

As seqüências de cDNA foram traduzidas e aquelas que geraram peptídeos diferentes foram alinhadas com base nas seqüências de aminoácidos utilizando o programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw). Para a construção das árvores filogenéticas foi utilizado o método do UPGMA por meio do programa Mega 3.1 (<http://www.megasoftware.net/>).

Resultados e Discussão

Com base na busca utilizando as palavras chaves “metallothionein+poaceae” foram encontrados os seguintes resultados no banco de dados do NCBI: milho - 9 clones sob estresse salino, 6 em folha, 1 no endosperma, seqüências nas patentes WO2005063997 e WO2005063998; arroz - 80 clones de *Oryza rufipogon*, 26 de *Oryza sativa*; 14 clones de trigo, 3 clones de *Eleusine indica*; 3 clones de *Cyodon dactylon*; 4 clones de cevada; 1 clone *Poa secunda*; 1 clone de *Porteresia coartacta*; 2 clones de *Festuca rubra*; cana-de-açúcar - 103 clones de caule maduro e 15 clones sob tratamento com metil jasmonato. Considerando o grande número de clones tanto de cDNAs quanto genômicos representando genes de metalotioneína de diferentes gramíneas, decidiu-se utilizar apenas as seqüências de arroz e milho depositadas no TIGR, onde foram encontrados 44 clones de arroz e 55 de milho.

As 55 seqüências de milho foram agrupadas e traduzidas, sendo consideradas para elaboração da árvore, apenas aquelas cujas proteínas não eram idênticas. Assim, foram identificados 10 genes de milho no banco de dados do TIGR, que foram analisados juntamente com os 3 genes descritos na literatura (Chevalier *et al.*, 1995; de Framond, 1991; Charbonnel-Campaa *et al.*, 2000), cujas seqüências foram agrupadas na Figura 1. Na Figura 2, estes genes de milho foram analisados juntamente com alguns exemplares de arroz, trigo, cevada, sorgo e cana-de-açúcar.

O agrupamento realizado com base nas seqüências de aminoácidos demonstrou uma grande diversidade dentro da família multigênica das metalotioneínas em gramíneas, principalmente entre os clones de milho, que apresentaram uma ampla dispersão entre as gramíneas, agrupando juntamente com clones de arroz, trigo e cevada (Figura 2). Contudo, deve-se considerar que várias seqüências gênicas codificam para uma mesma proteína,

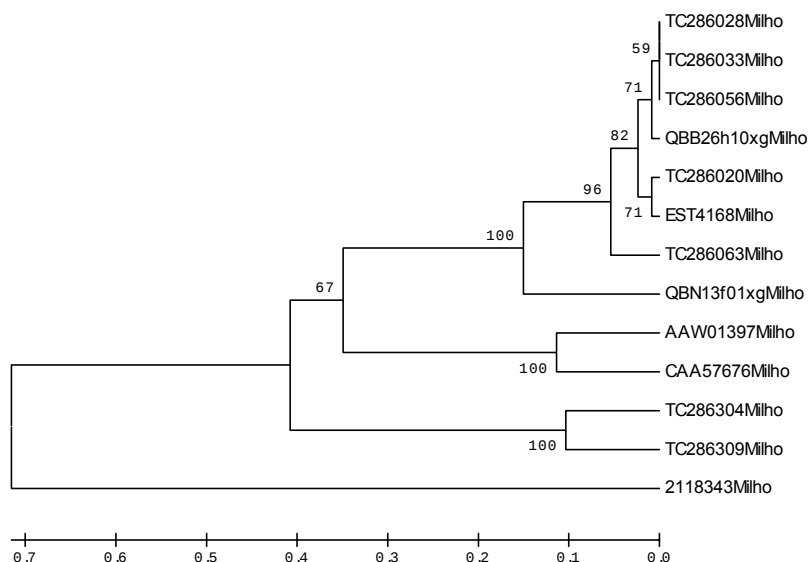


Figura 1. Análise filogenética dos clones de metalotioneína de milho alinhadas com base nas seqüências de aminoácidos dos cDNAs traduzidos e das proteínas. O agrupamento foi realizado utilizando o método do UPGMA com o software Mega 3.1. Os números em cada agrupamento foi determinado por 1000 bootstraps.

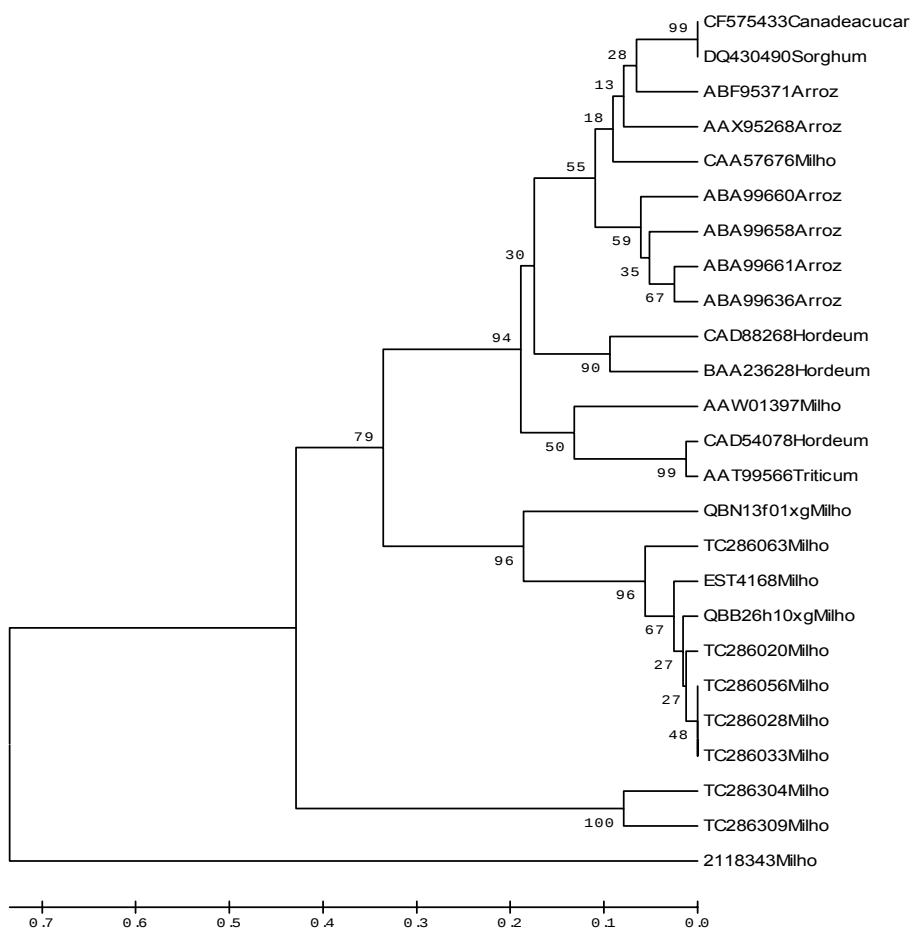


Figura 2. Análise filogenética dos principais membros da família das metalotioneínas de arroz, trigo, cevada, sorgo, cana e milho. O alinhamento foi realizado com base nas seqüências de aminoácidos dos cDNAs traduzidos e das proteínas, sendo agrupadas utilizando o método do UPGMA com o software Mega 3.1. Os números em cada agrupamento foi determinado por 1000 bootstraps.

indicando que as diferentes seqüências podem representar variações alélicas expressas em diferentes tecidos, genótipos ou quando submetidos a diversos tipos de estresse.

Dentre as seqüências de metalotioneínas existentes no banco de dados da Embrapa, foram identificados quatro *contigs*, todos eles contendo seqüências advindas de bibliotecas subtrativas de arroz inoculado com o patógeno *Magnaporthe grisea* agente causador da brusone em arroz (Figura 3). O *contig* 192 possui dois clones e apresentada uma homologia de 120 pares de base (pb) com um CDS de metalotioneína de arroz (AAX95269.1). O *contig* 209 é composto por quatro clones idênticos que possuem 66 pb de homologia com o clone de metalotioneína de arroz (AAB04675.1). A seqüência OSMGB_01_A01 possui homologia de 60 pb com o clone de metalotioneína de arroz (AAT85108.1). O *contig* 179 possui sete seqüências que apresentam homologia de 126 pb com o clone de metalotioneína de arroz (AA084040.1).

Apesar das metalotioneínas estarem relacionadas com a detoxificação de metais pesados, só foram identificadas seqüências homólogas à metalotioneína em bibliotecas de arroz inoculadas com o *Magnaporthe grisea*. Tais resultados sugerem que esses genes podem estar envolvidos em outros estresses, incluindo resistência a doenças em plantas.

O presente trabalho apresenta uma comparação entre as seqüências de genes que codificam para metalotioneínas em gramíneas disponíveis em bancos de dados e aquelas obtidas a partir de genótipos de arroz resistentes ao patógeno. Assim, as regiões conservadas e divergentes entre tais seqüências poderão ser exploradas para a construção de *primers* que amplifiquem membros específicos da família das metalotioneínas. A descrição de regiões específicas desses membros será de grande importância para estudos futuros da expressão dos mesmos sob diferentes condições de estresse e a identificação daqueles associados com estresses amplos e específicos, ambos de grande interesse para trabalhos posteriores de clonagem.

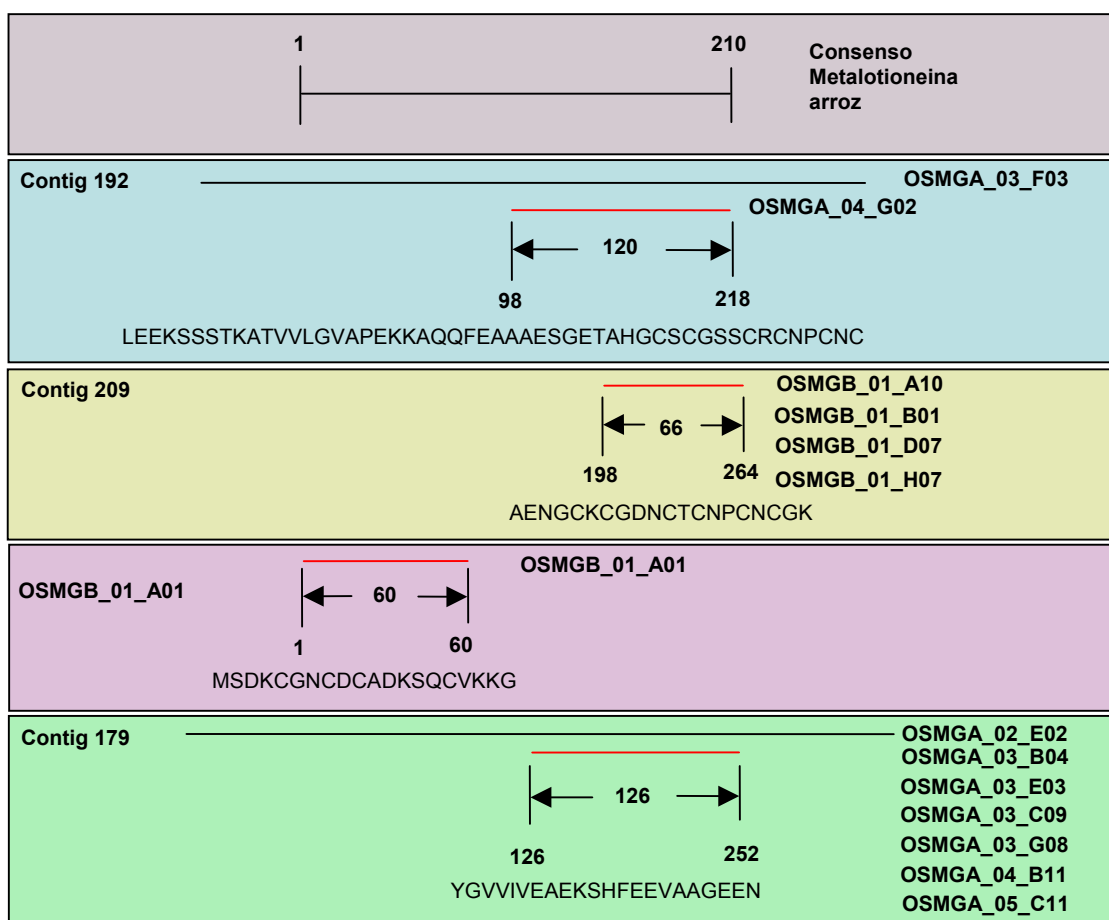


Figura 3. Descrição dos *contigs* encontrados nas seqüências geradas a partir de bibliotecas subtrativas de diferentes espécies de gramíneas sob diferentes condições de estresse. Foram encontrados quatro *contigs* de arroz inoculado com o patógeno *Magnaporthe grisea* apresentando homologia com clones de metalotioneina, cujas regiões estão descritas em vermelho.

Literatura Citada

- CALLAHAN, L. D. et al. *Plants. Journal Biol. Inorg. Chem.*, Melbourne, v. 11, p. 2-12, 2006.
- CHARBONNEL-CAMPAA, L. et al. *Gene*, v. 254, p. 199-208, 2000.
- CHEVALIER, C. et al. *Plant Molecular Biology*, Bourdeaux, v. 28, n. 3, p.473-485, Jun. 1995.
- EAPEN, S. & D'SOUZA, S. F. *Biotechnology Advances*, Mumbai, v. 23, p. 97-114, 2005.
- FRAMOND, A. J. *A Federation of European Biochemical Societes*, v. 290, n. 1,2, p. 103-106, 1991.
- GUO, W. et al. *New Physiologist*, Purdue, v. 159, p. 369-381, 2003.
- HALL, J. L. *Journal of Experimental Botany*, Southampton, v. 53, n. 366, p. 1-11, Jan. 2002.
- MIR, G. et al. *Journal of Experimental Botany*, Montilivi, v. 55, n. 408, p. 2483-2493, Dec. 2004.
- ROBINSON, N. J. et al. *Biochemical Journal*, Los Alamos, v. 295, p. 1-10, 1993.
- FIGUEIRA, A. et al. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4), 207-220 (2001)