

Análise da expressão de genes induzidos por fósforo em genótipos contrastantes de milho selecionados para eficiência do uso de fósforo

Maria José V. Vasconcelos¹ e Kashchandra G. Raghothama²

¹ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa postal 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.
mjose@cnpms.embrapa.br

² Departamento de Horticultura, Purdue University, 47906, West Lafayette, IN , USA

Palavras-chave: Fosfato, RNA, Transportadores de fosfato (Pi), *Zea mays* L.

Introdução

O fósforo (Pi) é um dos nutrientes mais importantes para as plantas sendo um componente integral de um grande número de compostos importantes presentes nas células, incluindo nucleotídeos do metabolismo energético, ácidos nucleicos, fosfolipídios de membrana, entre outros. Portanto, a deficiência deste elemento na planta compromete de forma geral todo seu metabolismo, causando uma severa redução na produção. Este elemento entretanto está pouco disponível para as plantas devido a sua interação química com cátions no solo, principalmente alumínio e ferro. O íon fosfato presente na solução do solo é absorvido pelas raízes por difusão o que cria uma região de depleção deste elemento na interface solução do solo/superfície radicular. Para restaurar novamente o equilíbrio da solução do solo, ocorre uma desorção do fósforo lábil associado as micelas de argila do solo. As plantas podem tornar este processo mais eficiente aumentando a sua superfície radicular e/ou melhorando a nível celular, a eficiência de absorção deste elemento. A absorção do íon fosfato para o interior das células da raiz, se dá exclusivamente por intermédio de proteínas transportadoras associadas a membrana plasmática. O número destas proteínas transportadoras, assim como a indução de uma classe específica de proteínas transportadoras sintetizada quando a planta sofre estresse de fósforo, podem ser uma das possíveis explicações para o comportamento de maior eficiência ao baixo fósforo que determinados genótipos de plantas possuem. Uma outra hipótese, citada na literatura, é a de exudação de ácidos orgânicos pelas raízes, promovendo a liberação do íon fosfato adsorvido nas partículas do solo. A acidificação da rizosfera é observada para um grande número de espécies de plantas como uma resposta à deficiência de fósforo (Gardner et al., 1983; Lipton et al., 1987; Hoffland, et al., 1989; Fuente et al., 1997). Uma das mais recentes respostas moleculares a deficiência de Pi é a indução dos transportadores de fosfato. Neste estudo, nós caracterizamos a regulação da transcrição de seis genes transportadores de fosfato em genótipos de milho contrastantes para eficiência do uso de Pi.

Material e Métodos

Os genótipos de milho (*Zea mays* L.) foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Estes genótipos foram selecionados baseados em sua resposta a aplicação de Pi como eficiente e ineficiente ao uso de fósforo (Tabela 1). Sementes de milho foram germinadas e transferidas para solução nutritiva de Hoaglands meia força e crescidas uma

semana em solução completa. Após uma semana parte das plantas foram transferidas para solução nutritiva sem fósforo e outras para soluções contendo diferentes concentração deste elemento (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 μM de Pi). Durante o experimento as soluções nutritivas foram trocadas a cada dois dias para manter o pH e a concentração dos nutrientes. Após 15 dias de tratamento, raiz, caule e folhas foram coletados e congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80°C . RNAs foram extraídos pelo método de fenol para as análises por Northern blot.

Tabela 1. Material genético

Genótipos de Milho	
Eficiente	Ineficiente
L-03	L-16
L-11	L-22
L-36	L-723
L-161-1	L-5046

Resultados e Discussão

A nível molecular muitos estudos têm considerado o efeito do estresse de fósforo e sua aquisição pela interface raiz:solo. Estudos tem demonstrado que o baixo fósforo tem induzido genes transportadores de fósforo (Davies et al., 2002; Mudge et al., 2002; Shin et al., 2004), RNAses e fosfatases (Bariola et al., 1994; Abel et al., 2000). O arranjo da resposta molecular tem sido associado com o aumento da exploração do solo, liberação do Pi de formas complexas e sua aquisição. Muitos deste estudos indicaram a resposta molecular da planta a deficiência de fósforo, mas ainda não é conhecido onde esses atributos moleculares têm contribuído para o uso eficiente de fósforo pela planta. Desde que transportadores de alta afinidade de fosfato (Pi) mostraram sua indução em resposta ao Pi estresse em diferentes espécies de planta (Raghothama, 1999), nós caracterizamos seis transportadores de Pi em milho (*ZmPTs* - Patente nº W09958657) obtidos da Pioneer Hybrid Co. A seqüência de aminoácidos destes transportadores revelou alta homologia com transportadores de Pi de aveia, *Arabidopsis*, tomate, sorgo e arroz (Figura 1). Resultados mostraram que os transportadores de Pi em milho são induzidos quando a planta de milho é crescida em baixa concentração de Pi (0-25 μM) (Figura 2). Desde que este genes tem sua indução em baixo Pi, isto leva a concluirmos que os transportadores de Pi de alta afinidade desempenham um papel crítico na aquisição de fósforo pela planta. O padrão de expressão temporal dos transportadores de Pi em milho tiveram similar resposta. Entretanto, o papel do Pi na regulação da transcrição destes transportadores pode ser demonstrada quando plantas de milho foram re-supridas com fosfato (Figura 3).

Os resultados obtidos concordam com estudos anteriores onde transportadores de Pi de alta afinidade em diferentes espécies de planta tem sido regulados por Pi (Karthikeyan et al., 2002; Daram et al., 1998; Liu et al., 1998). Vários estudos sugerem que a expressão dos genes que codificam transportadores de fósforo para alta afinidade tem sua transcrição regulado em resposta ao Pi da planta..

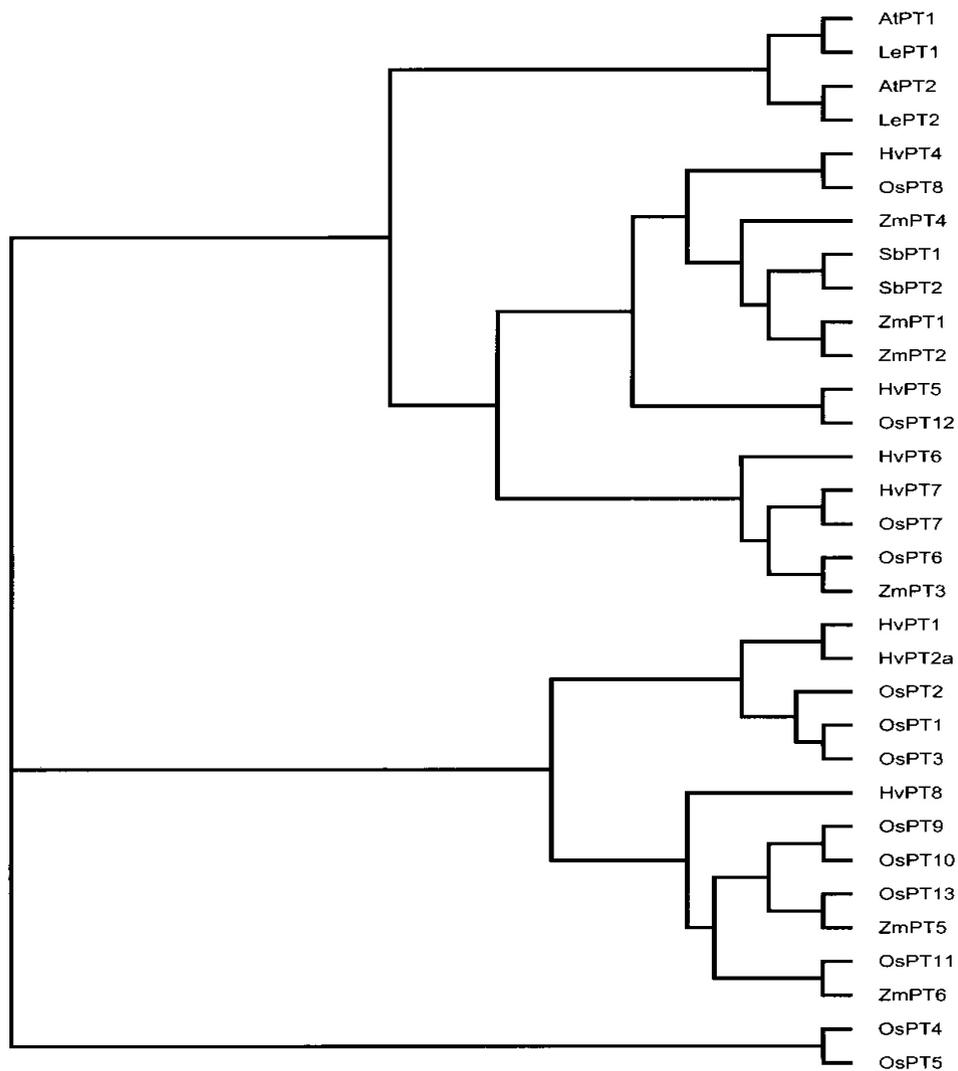


Figura 1. Análise filogenética de transportadores de fosfato em plantas. Árvore filogenética foi dos transportadores de fosfato foi construída usando-se o ClustalX. NJ-plot. Abreviaturas mostra os respectivos transportadores. *ZmPT* *Zea mays* fosfato transporter; *AtPT* *Arabidopsis thaliana* fosfato transporter; *LePT* *Lycopersicon esculentum* fosfato transporter; *OsPT* *Oryza sativa* fosfato transporter; *HvPT* *Hordeum vulgare* fosfato transporter; *SbPT* *Sorghum bicolor* fosfato transporter

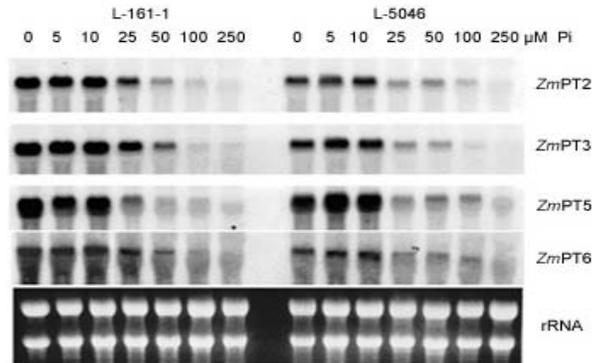


Figura 2. Northern blot dos genes *ZmPTs* induzidos sob estresse de fósforo. RNA total isolado de plantas de milho crescida em meia força de solução nutritiva de Hoaglands modificada (Li et al., 1997) contendo diferentes concentrações de Pi (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 μM) por 15 dias. Todas as sondas foram marcadas com ^{32}P . O painel abaixo do Northern blot foi corado com brometo de etídio para demonstrar a integridade e a uniformidade do RNA.

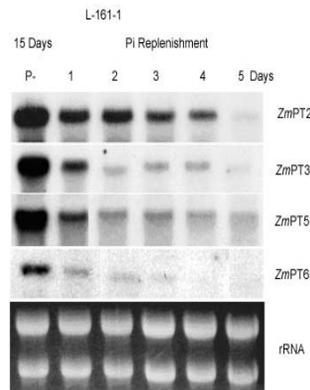


Figura 3. Northern blot dos genes *ZmPTs* induzido sob estresse de fósforo e re-suprido com Pi. RNA total isolado de milho crescidos em meia força de solução nutritiva de Hoaglands modificada (Li et al., 1997) contendo 0 μM por 15 dias. Após 15 dias as plantas foram re-supridas com 250 μM de Pi. Todas as sondas foram marcadas com ^{32}P . O painel abaixo do Northern blot foi corado com brometo de etídio para demonstrar a integridade e a uniformidade do RNA.

Literatura citada

- Abel S, Nurnberger T, Ahnert V, Krauss G-J, Glund K** (2000) Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. *Plant Physiol* **122**: 543-552
- Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ** (1994) The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J.* **6**: 673-658
- Daram P, Brunner S, Persson BL, Amrhein N, Bucher M** (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**: 225-233
- Davies TGE, Ying J, Xu Q, Li ZS, Li J, Gordon-Weeks R** (2002) Expression analysis of putative high-affinity phosphate transporters in Chinese winter wheats. *Plant Cell Environ* **25**: 1325-1339
- Fuente, J. M.; Rodríguez, V. R.; Ponce, J. L. C.; Estrella, L. H.** Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, **276**: 1566-1568, 1997.
- Gardner, W. K., Barber, D. A., Parbery, D. G.** The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant and Soil*, **70**: 107-124, 1983.
- Hoffland, E., Findenegg, G. R., Nelemans, J. A.** Solubilization of rock phosphate by rape. *Plant and Soil*, **113**:161-165, 1989.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B, Raghothama KG** (2002) Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. *Plant Physiol* **130**: 221-233
- Lipton, G. S., Blanchar, R. W., Blevins, D. G.** Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.*, **85**: 315-317, 1987.
- Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Konowicz AK, Raghothama KG** (1998) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. *Plant Physiol* **116**: 91-99
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW** (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis. *Plant J* **31**: 341-353
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 665-693
- Shin H, Shin H-S, Dewbre GR, Harrison MJ** (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* **39**: 629-642