

Análise de expressão do gene *Al* induzido por estresse de fósforo em genótipos de milho eficiente e ineficiência ao uso de fósforo.

Maria José V. de Vasconcelos¹ e Kashchandra G. Raghothama²

¹ Embrapa Milho e Sorgo, 35701-970, Sete Lagoas-MG, Brazil,

² Departamento de Horticulture, Purdue University, West Lafayette-IN 47907

Palavras-chave: Antocianina, microarranjos, *Zea mays*, Northern blot

Introdução

A disponibilidade e a absorção de fósforo são dois fatores determinantes na nutrição de plantas. Para contornar ao estresse de fósforo, as plantas desenvolvem complexos mecanismos de adaptação, tais como modificações nos processos metabólicos (metabolismo de carbono), mudanças em morfologia (arquitetura de raiz) e aumento em atividades enzimáticas (fosfatases e RNAses). Muitas adaptações ao estresse de fósforo como ativação de enzimas glicolíticas e aumento da produção de RNAses tem mostrado um aumento da eficiência do uso de fósforo (Bosse e Kock, 1998; Plaxton e Carswell, 1999). Estas adaptações aumentam tanto, a eficiência do uso de fósforo quanto permite o contínuo metabolismo em baixas concentrações de fósforo na célula. Existe informação suficiente para sugerir que a resposta ao estresse de fósforo é mediada pela expressão de um grande número de genes. Muitos destes genes que codificam para fatores de transcrição e proteínas sinais são alteradas em resposta a estresse de fósforo, implicando maiores trocas regulatórias no crescimento e desenvolvimento celular (Wu et al., 2003).

A tecnologia de microarranjos de DNA tem possibilitado a análise global das alterações na expressão dos genes e revelado uma rede coordenada da regulação gênica (Lockhart et al., 1996; Wu et al., 2001). A avaliação dos níveis de expressão de milhares de genes pelo microarranjo em paralelo serve como uma importante ferramenta para o estudo funcional do genoma, e expressão baseada em genes com funções desconhecidas tem sido atribuídos prováveis papéis. Pelo uso desta tecnologia, muitos novos genes que estão envolvidos em resposta a nutrientes tem sido identificados com sucesso (Wang et al., 2000). Recentemente, vários estudos de expressão gênica em respostas a estímulos do ambiente têm sido reportados. Entre eles inclui: luz (Ma et al., 2001, 2002, 2003; Tepperman et al., 2001; Wang et al., 2002), ciclo circadiano (Harmer et al., 2000), nitrogênio (Wang et al., 2000), patógenos (Maleck et al., 2000; Schenk et al., 2000), estresse abiótico (Kawasaki et al., 2001; Seki et al., 2001), deficiência de ferro (Thimm et al., 2001), deficiência de zinco (Lyons et al., 2000) e deficiência de fósforo (Wu et al., 2003; Wasaki et al., 2003; Uhde-Stone et al., 2003). E também em desenvolvimento da semente (Girke et al. 2000). Neste estudo nós examinamos a expressão gênica em milho, de um gene envolvido na via metabólica da antocianina, *Al* gene. *Al* gene foi identificado em análises de microarranjos pelo aumento de sua expressão em plantas de milho submetidas ao estresse de fósforo.

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 Hoagland's 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 diferente 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 análises de Northern.

Tabela 1. Genótipos de milho selecionados para eficiência ao uso de fósforo. Embrapa - Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG), Brasil.

Genótipos de milho	
Pedigree	Resposta ao Pi
L-03	Eficiente
L-11	Eficiente
L-16	Ineficiente
L-22	Ineficiente
L-36	Eficiente
L- 723	Ineficiente
L-161-1	Eficiente
L-5046	Ineficiente

A seleção dos genótipos de milho foi feita em plantas crescidas em latossolo vermelho escuro com alto e baixo níveis de fósforo (2mg/kg e 15mg/kg, respectivamente). Baseado na produção comparativa de grãos os genótipos descritos na Tabela 1 foram classificados quanto a eficiência e resposta ao uso de fósforo do solo (Parentoni, 1999).

Resultados e Discussão

Os flavonóides representam um grande grupo de metabólitos secundários em plantas, dos quais antocianina é um das maiores classe devido ao amplo espectro de cores resultante de sua síntese (Holton and Cornish, 1995). Sua produção e localização nos tecidos podem contribuir para o desenvolvimento de plantas resistentes a vários estresses ambientais (Chalker-Scott 1999). Entre as diversas respostas ao estresse de fósforo, o acúmulo de flavonóides do tipo antocianina em plantas deficientes ao Pi é uma das mais notáveis características. Sob deficiência de fósforo, plantas de milho acumulam significativas quantidades de antocianina (Figura 1A). Produção deste composto requer a indução da expressão de vários genes regulatórios e estruturais. Um dos genes envolvidos na via metabólica da antocianina é o gene *AI*, que codifica para a enzima dihydroflavonol 4-reductase – DHR (Reddy et al., 1987). Mutações recessivas do gene *AI* leva a camada incolor da aleurona (Neuffer et al., 1968). Esta enzima está envolvida em dois braços da via

metabólica dos flavonóides (Styles and Ceska, 1975; Styles and Ceska, 1989). Neste estudo, diferenças quantitativas do acúmulo de antocianina em genótipos de milho crescidos em presença e ausência de fósforo foram observadas (Figura 1B). Plantas de milho mostraram expressão diferenciada do gene *A1* (Figura 2) entre milhos eficientes e ineficientes. A expressão do gene *A1* é fortemente influenciada pelo nível de fósforo na solução nutritiva para ambos os genótipos eficientes e ineficientes. Raízes e folhas mostraram expressão deste gene, onde até o presente, não é claro a explicação para o acúmulo de antocianina em raízes de plantas. Parece que a ativação da via metabólica da antocianina pode liberar mais fósforo para suprir as necessidades da planta. A expressão do gene *A1* pode também ser relacionado com o acúmulo de antocianina, como um mecanismo de proteção do aparato de fotossíntese contra fotoinibição (Gould et al., 1995). Adicionalmente, a expressão do gene *A1* em raiz aponta para algum outro mecanismo o qual não envolve reações fotoquímicas observado em folhas. Mais estudos são necessários par examinar o papel da antocianina em raízes de plantas deficiente em fósforo.

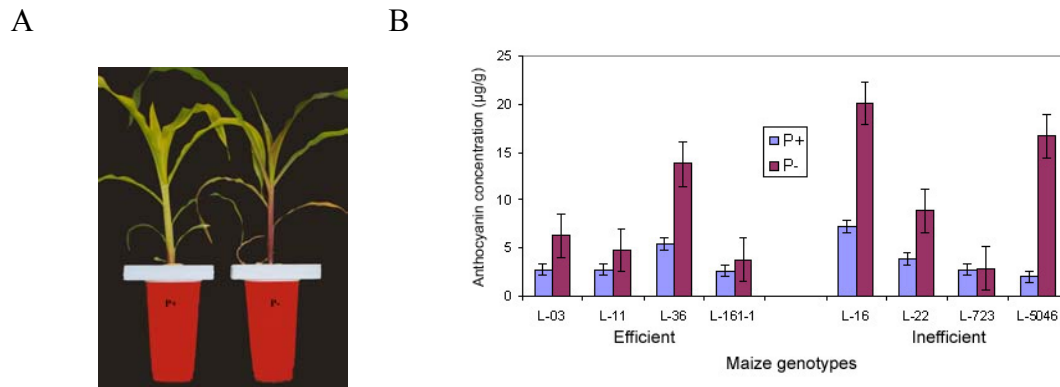


Figura 1. Acúmulo de antocianina em plantas de milho. A – Acúmulo de antocianina em plantas de milho submetidas ao estresse de fósforo. B - Quantificação de antocianina em genótipos de milho. Plantas de milho foram crescidas em solução nutritiva, por 15 dias, em presença (250 μM Pi) e ausência (0 μM Pi) de fósforo para quantificação de antocianina. Cada barra corresponde a medias de três repetições com erro padrão.

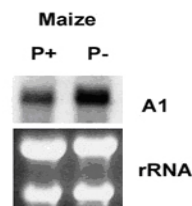


Figura 2. Northern blot do gene *A1* induzido sob estresse de fósforo. RNA total isolado de plantas de milho crescidas em meia força de solução nutritiva de Hoaglands modificada (Li et al., 1997) contendo 250 μM fosfato (+) ou zero μM fosfato (-) por 15 dias. Todas as sondas foram marcadas com ^{32}P . O painel abaixo do Northern blot foi corado com brometo de etidio para demonstrar a integridade e a uniformidade do RNA.

Literatura citada

- Bosse D, Kock M.** (1998). Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ.* **21**:325-332
- Chalker-Scott L** (1999) Environmental significance of anthocyanin in plant stress response. *Photochem Photobiol* **70**: 1-9
- Girke T, Todd J, Ruuska S, White J, Benning C, Ohlrogge J** (2000). Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol* **124**: 1570-1581
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated transcription of key pathway in *Arabidopsis* by circadian clock. *Sci* **290**: 2110-2113
- Holton TA, Cornish EC** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant cell* **7**: 1071-1083
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kaway K, Galbraith D, Bohnert H** (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**: 889-905
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown, EL** (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol.* **14**: 1675-1680
- Lyons TJ, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown P, Eide DJ** (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Nac Acad Sci USA* **97**: 7957-7962
- Ma L, Zhao HY, Deng XW** (2003) Analysis of the mutational effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development* **130**: 969-981
- Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao HY, Deng XW** (2002) Genomic evidence for COP1 as repressor of light regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2383-2398
- Ma L, Liu J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao HY, Deng XW** (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**: 2589-2607
- Maleck K, Levine A, Eugem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangel JL, Dietrich RA** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* **26**: 403-410
- Neuffer MG, Jones L, Zuber MS** (1968) The mutants of maize. Madson, WI: Crop Science Society of America
- Parentoni SN** (1999) Maize Genetic resources with contrasting phosphorus efficiency. In: Workshop on improving phosphorus acquisition efficiency in marginal soils. Sete Lagoas (MG), Brazil. October 17-23, 1999. pp X-1:7
- Plaxton WC, Carswell MC** (1999) Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *In* Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization. Lerner HR ed, Marcel Dekker Inc, NY, pp 349-372
- Reddy AR, Britsch L, Salamine F, Saeder H, Rohde W** (1987) The *Al* (Anthocyanin 1) locus in *Zea mays* encodes dihydroquercetin reductase. *Plant Sci* **52**: 7-13
- Styles ED, Ceska O** 1975 Genetic control of 3-Hydroxy-and 3-deoxy-flavonoids in *Zea mays*. *Phytochemistry* **14**: 413-415

- Styles ED, Ceska O** (1989) Pericarp flavonoides in genetic strains of *Zea mays*. *Maydica* **34**: 227-237
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson J, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11655- 11660
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuko M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1,300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stress by using a full length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72
- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH** (2001) Multiple transcription-factor gene are early target of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9437-9442
- Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, Buckhout T** (2001) Response to *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarrays analysis. *Plant Physiol* **127**: 1030-1043
- Uhde-Stone C, Zinn KE, Ramire-Yanez M, Li A, Vance CP, Allan DL** (2003) Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of White Lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiol* **132**: 1064-1079
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM** (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* **12**: 1491-1509
- Wang H, Ma LG, Habashi J, Li JM, Zhao HY, Deng XW** (2002) Analysis of far-red light regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutant in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 723-733
- Wasaki J, Yometani R, Shinano T, Kai M, Osaki M** (2003) Expression of the OsPI1 gene, cloned from rice roots using cDNA microarray, rapidly responds to phosphorus status. *New Phytol* **158**: 239-248
- Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, Deng XW** (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol* **132**: 1260-1271
- Wu S-H, Ramonell K, Gollub G, Somerville S** (2001) Plant gene expression profiling with DNA microarrays. *Plant Physiol Biochem* **39**:917-926