

## Caracterização de Genes Induzidos Por Alumínio No Ápice De Raízes De Gramineas por Ferramentas de Bioinformática

Claudia T. Guimarães<sup>(1\*)</sup>, Janaína O. Melo<sup>(2)</sup>, Eliane A. Gomes<sup>(1)</sup>, Newton P. Carneiro<sup>(1)</sup>, Marcos M. Costa<sup>(3)</sup>, Felipe R. Da Silva<sup>(3)</sup>, Nádia C. Lângaro<sup>(4)</sup>, Luiz C.B. Carvalho<sup>(3)</sup>, Vera M. C. Alves<sup>(1)</sup>, Antônio Á.C. Purcino<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35.701-970, Sete Lagoas, MG [claudia@cnpms.embrapa.br](mailto:claudia@cnpms.embrapa.br), <sup>(2)</sup> Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-000, <sup>(3)</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, <sup>(4)</sup> Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS

### Introdução

A toxidez de alumínio é um dos fatores mais limitantes à produtividade das lavouras cultivadas em solos ácidos. O ápice da raiz é o sítio primário da ação tóxica do Al e o sintoma mais visível desse estresse é a inibição do crescimento do sistema radicular e, conseqüentemente, da absorção de nutrientes e água (Ryan et al., 1993). Os primeiros efeitos do Al em processos metabólicos podem ser observados poucos minutos após a indução do estresse, os quais são seguidos de efeitos secundários que aparecem depois de várias horas ou dias. Entre os primeiros sintomas de toxidez estão a inibição da absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , redução no efluxo de  $\text{K}^+$ , formação de calose e excreção de ácidos orgânicos (Rengel, 1996). Vários são os mecanismos que as plantas utilizam para sobreviver aos efeitos tóxicos do Al e, conseqüentemente, espera-se que exista variabilidade genética para tolerância ao Al tóxico entre as gramíneas, especialmente entre as espécies que evoluíram em nichos ecológicos diferentes. Portanto, é importante que essa variabilidade genética seja acessada e caracterizada, para que esse conhecimento possa ser utilizado na geração de novos materiais comerciais mais adaptados aos solos ácidos. A comparação por ferramentas de bioinformática e a análise de expressão de seqüências obtidas a partir de bibliotecas de cDNA produzidas utilizando genótipos contrastantes em tolerância ao Al, pode gerar informações importantes sobre os mecanismos envolvidos nos processos fisiológicos e bioquímicos da tolerância. Portanto, o objetivo desse trabalho foi gerar bibliotecas produzidas por hibridações subtrativas e PCR supressivo (SSH) utilizando genótipos tolerantes de milho, sorgo, arroz, trigo, cevada, aveia e braquiária e processar os dados obtidos utilizando ferramentas de bioinformática e de análise de expressão gênica, numa tentativa de se identificar seqüências putativas de genes de tolerância ao Al em gramíneas.

### Materiais e Métodos

Os genótipos de milho, sorgo, arroz, trigo, cevada, aveia e braquiária foram previamente identificados como tolerantes ao Al tóxico. Sementes de cada espécie foram germinadas em papel toalha por 5-7 dias, e plântulas de tamanho uniformes foram transferidas para soluções nutritivas com ausência (cDNA controle) e presença (cDNA teste) do nível crítico de Al por tempos que variaram de 1 a 24 horas. O nível crítico para cada espécie foi definido como a concentração de Al capaz de reduzir em 50% o crescimento radicular da raiz principal das plântulas após 9 dias de cultivo. Para construção das bibliotecas, utilizaram-se ápices radiculares que foram colhidos em nitrogênio líquido e mantidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do RNA total. A obtenção do RNA foi feita em colunas de oligot dT e, para a construção das bibliotecas SSH, utilizou-se o kit PCR-Select cDNA Subtraction (BD Biosciences) conforme instruções do fabricante. As 12

bibliotecas construídas estão listadas na Tabela 1. Os clones obtidos foram sequenciados no sequenciador automático de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems) e os cromatogramas obtidos foram analisados utilizando-se a plataforma BIOFOCO ([www.genoma.embrapa.br](http://www.genoma.embrapa.br)). As seqüências (ESTs) que tinham no mínimo 150 pares de base e Phred maior que 20 foram clusterizadas entre e dentro de cada biblioteca e a procura por similaridade foi feita por Blast X e BlastN (Altschul et al., 1997) em bancos de dados da NCBI, TIGR, Maize Genomic DataBase e Rice Genomics. A classificação funcional dos clusters de ESTs foi realizada de acordo com o TIGR Gene Index.

### **Resultados e Discussão**

Das 1285 seqüências (ESTs) submetidas para avaliação pelo programa BIOFOCO, 756 ESTs (58,8%) eram de alta qualidade, com mais de 150 pb e Phred 20. Essas 756 ESTs foram agrupadas em 114 clusters e 417 singletons (Tabela 2). Dos 114 clusters identificados, 96 foram montados a partir de ESTs gerados em uma mesma biblioteca e 18 clusters foram montados com ESTs de diferentes bibliotecas, sugerindo que esses 18 genes putativos foram expressos no mínimo em duas espécies. Depois de categorizadas, 440 ESTs mostraram similaridade significativa com seqüências de proteínas com funções já conhecidas, 67 com proteínas hipotéticas e 231 não mostraram similaridade com qualquer proteína depositada no GenBank, no TIGR e no Maize DGB. As proteínas sem similaridade e as proteínas hipotéticas sugerem que o Al regula a ação de genes ainda desconhecidos. Setenta e sete por cento de todas ESTs estavam presentes em bibliotecas específicas, mas 33% eram comuns a varias bibliotecas. (Tabela 3). As seqüências mais expressas nas bibliotecas SSH desenvolvidas nesse estudo aparecem na Figura 1 e incluem a presença de alguns genes que já foram descritos como de tolerância a estresses bióticos e abióticos, como a calreticulina e a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH). A calreticulina tem alta capacidade de se ligar ao  $Ca^{2+}$ , e já foi descrita como uma proteína capaz de aumentar a tolerância das plantas ao estresse causado por salinidade e choque térmico (Sarah et al., 2002). Cinco clusters de calreticulina foram identificados nas bibliotecas de arroz, braquiária, centeio, milho e sorgo, totalizando 39 ESTs (Figura 2). A expressão de 88 ESTs escolhidas ao acaso esta sendo avaliada em macroarranjos para validação desses resultados.

### **Literatura citada**

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402, 1997.
- Rengel, Z. 1996. Uptake of aluminium by plant cells. 1996. *New Phytol.* 134:389-406
- Ryan, P.R., J.M. DiTomaso. L.V. Kochian. 1993. Aluminum toxicity in roots: an investigation on spatial sensitivity and the role of the the root cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446
- Sarah, E.W., P.L. Tsou, D. Robertson, D. 2002. Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increases bioavailable calcium stores in plants. *Transgenic Res.* 11: 1 – 10.

Tabela 1: Genótipos e condições experimentais utilizadas para produção dos ápices de raízes das gramíneas utilizadas para construção de 12 bibliotecas SSH contendo seqüências induzidas por alumínio

Espécie	Genótipos	Condições Experimentais		Identificação da biblioteca
		$\mu\text{M}$ de $\text{Al}^{3+}$	Duração do tratamento (h)	
<i>Brachiaria decumbens</i>	Brasilisk	1000	1	BDAL
<i>Avena sativa</i> , aveia	Moreninha	740,7	1	ASMOAL
<i>Oryza sativa</i> , arroz	CNA 6558-Fernandes	555	1	OSFEAL
<i>Zea mays</i> , milho	Cateto 247	222	1	ZMCTAL1H
		222	4	ZMCTAL4H
		222	24	ZMCTAL24H
	L3	222	1	ZML3AL1H
		222	4	ZML3AL4H
		148	1	SBSCAL1H
<i>Sorghum bicolor</i> , sorgo	SC283	148	4	SBSCAL4H
		148	1	SBSCAL1H
<i>Triticum aestivum</i> , trigo	BH 1146	74,1	1	TABHAL
<i>Hordeum vulgare</i> , cevada	FM 404	18,5	1	HVFMAL

Tabela 2 – Numero de seqüências submetidas para análise de qualidade, de seqüências aceitas e de clusters gerados para cada biblioteca de cDNA

Biblioteca	Número de seqüências submetidas para análise	Numero de seqüências aceitas	Número de singletons	Número de clusters
ASMOAL	192	87	26	22
BDAL	163	90	27	14
HVFMAL	192	33	8	6
OSFEAL	160	129	89	17
SBSCAL1H	68	65	46	8
SBSCAL4H	66	55	20	7
TABHAL	192	54	20	13
ZMCTAL1H	96	94	51	4
ZMCTAL4H	45	43	28	3
ZMCTAL24H	48	48	48	0
ZML3AL1H	18	17	13	2
ZML3AL4H	45	41	41	0

<b>Total</b>	1285	756	417	96
--------------	------	-----	-----	----

Tabela 3 –Funções mais expressas nas bibliotecas de milho, sorgo, arroz, trigo, aveia, cevada e braquiária em resposta ao nível crítico de alumínio para cada espécie.

Função	Número de seqüências validas	% do total	Biblioteca						
			AS	OS	BD	HV	ZM	SB	TA
Transdução de sinal	158	20,90	AS	OS	BD	HV	ZM	SB	TA
Metabolismo	104	13,76	AS	OS	BD		ZM	SB	TA
Transcrição	80	10,58	AS	OS	BD	HV	ZM	SB	TA
Tradução	56	7,41	AS	OS	BD		ZM	SB	TA
Replicação, dobramento e reparo de DNA	33	4,37	AS	OS			ZM	SB	TA
Transportador de membrana	18	2,38	AS	OS	BD		ZM	SB	TA
Estrutura celular	9	1,19		OS		HV		SB	TA
Sem similaridade	231	30,56	AS	OS	BD	HV	ZM	SB	TA
Proteína hipotética	67	8,86		OS	BD		ZM	SB	TA
<b>Total</b>	<b>756</b>	<b>100</b>							

Figura 1 – Seqüências mais expressas nas bibliotecas SSH de milho, sorgo, arroz, trigo, aveia, cevada e braquiária, em resposta ao nível crítico de alumínio para cada espécie.

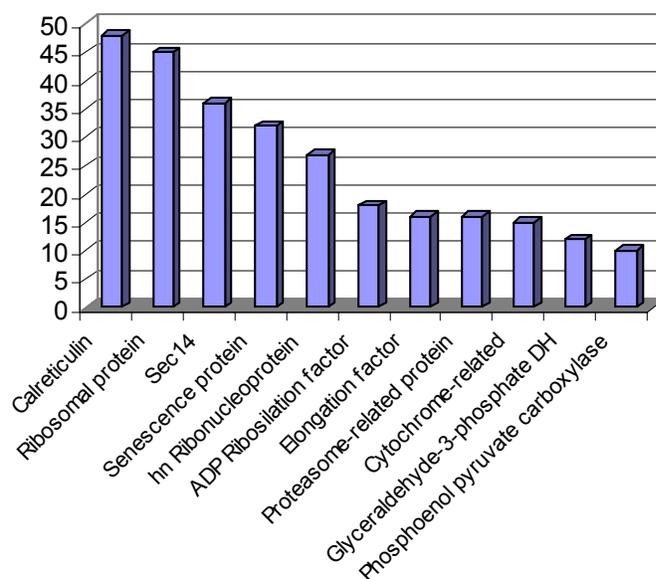


Figura 2 – Distribuição por biblioteca, das seqüências putativas significativamente enriquecidas no ápice de raízes de plantas tratadas com o nível crítico de Al.

