

ESTUDO DO MECANISMO DE HIPERACUMULAÇÃO DE NÍQUEL EM PLANTAS NATIVAS DO CERRADO

Paes-Leme, V.B.1; Cordeiro, M.C.R.2; Nagata, T.3; Oliveira-Filho, E. C.4; Aquino, F.G.5; Miranda, Z.G.6; Fragoso, R.R.7; Silva, M. S.8; Barros, L.M.G.9; Almeida, J.10; & Andrade, L.R.M.11.

¹ Bolsista / Estagiário, Embrapa Cerrados, vinciopaesleme@gmail.com; ² Pesquisadora, Embrapa Cerrados, Cristina@cpac.embrapa.br; ³ Professor Adjunto, UnB, latsuya@unb.br; ⁴ Pesquisador, Embrapa Cerrados, Cyrino@cpac.embrapa.br; ⁵ Pesquisadora, Embrapa Cerrados, Fabiana@cpac.embrapa.br; ⁶ Pesquisador, Embrapa Cerrados, zenilton@cpac.embrapa.br; ⁷ Pesquisador, Embrapa Cerrados, Rodrigo.fragoso@cpac.embrapa.br; ⁸ Pesquisadora, Embrapa Cerrados, marilia@cpac.embrapa.br; ⁹ Pesquisadora, Embrapa Rec. Gen. e Biotecnologia, leila@cenargen.embrapa.br; ¹⁰ Pesquisadora, Embrapa Rec. Gen. e Biotecnologia, jalmeida@cenargen.embrapa.br; ¹¹ Pesquisadora, Embrapa Cerrados, leide@cpac.embrapa.br

Introdução

As regiões de Barro Alto e Niquelândia, GO, apresentam solos ricos em níquel (Ni) e, por isto são áreas de intensa mineração para obtenção de liga ferro-níquel. Esta atividade conduz a uma extensa degradação da flora nativa local. Um grupo de plantas desta região desenvolveu mecanismo(s) de adaptação à presença deste metal. Dentre este(s) mecanismo(s) encontra-se o de hiperacumulação de Ni e, essas plantas são conhecidas como hiperacumuladoras (Kidd *et al.*, 2007.).

O processo da hiperacumulação do Ni ainda é pouco compreendido e, o conhecimento dos mecanismos genéticos utilizados por estas plantas pode ser utilizado em estratégias de recuperação das áreas degradadas resultantes da mineração, como também aproveitados visando a fitoextração (Dinardi *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi investigar os possíveis processos de hiperacumulação de níquel em plantas nativas do Cerrado, da região de Barro Alto e Niquelândia, por meio da identificação de transcritos possivelmente relacionados a genes citados como aqueles participantes neste mecanismo como, por exemplo, as enzimas Serina acetil transferase (SAT), Nicotianamina sintase (NAS), Glutathione redutase (GR), Glutathione S transferase (GST). RNAs, de sete espécies de plantas nativas foram coletadas em áreas contendo alta e baixa disponibilidade, bem como ausência de níquel e, extraídos utilizando-se metodologia previamente estabelecida por Gasic *et al.* (2004), modificado por Cordeiro *et al.* (2008). A amplificação dos cDNAs para os transcritos codificadores das enzimas estudadas foi obtida em *reverse transcription* PCR (RT-PCR) utilizando-se *primers* degenerados desenhados a partir de regiões conservadas das sequências protéicas correspondentes para cada gene descritas no banco de dados do NCBI. Fragmentos de cDNA potencialmente espécie específicos foram observados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio para todos os genes testados e, estes têm sido objeto de clonagem e sequenciamento utilizando-se metodologia de rotina.

Pelo menos na espécie *Oxalis* spp. foi encontrado a expressão positiva para um transcrito da enzima SAT sendo que o nível desta expressão será analisada em RTqPCR.

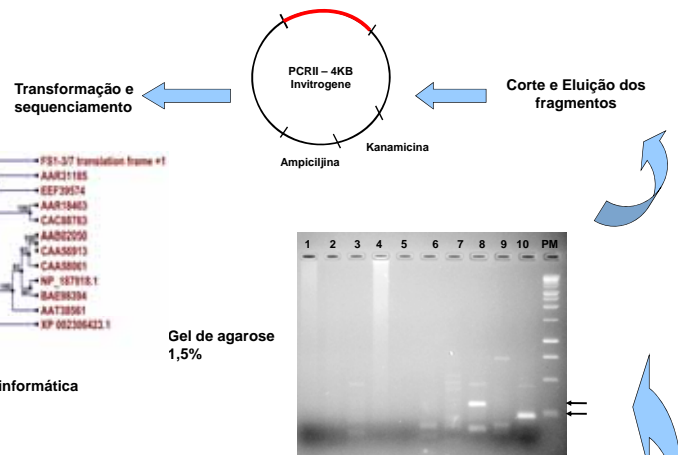
Material e Métodos

Material Vegetal – plantas nativas do cerrado (*Justicia lanstykii*, *Porophillum obscurum*, *Oxalis spp.*, *Lippia lupulina*, *Lippia spp.*, *Hyptis spp.*, *Heliotropium salicoides*) foram coletadas em regiões contendo níquel sob forma de alta, baixa disponibilidade, ausência do metal e, imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O material foi encaminhado ao laboratório para a extração do RNA.

Extração de RNA - Os RNAs das plantas coletadas foram extraídos utilizando-se a metodologia estabelecida por Gasic *et al.* (2004) modificada por Cordeiro *et al.* (2008).

RT-PCR e análise eletroforética – A partir do RNA total extraído das plantas foram sintetizados cDNAs utilizando a enzima transcriptase reversa MMULV (Promega, Inc.). Os cDNAs obtidos foram utilizados em RT-PCR com *primers* degenerados como por exemplo SAT1F, SAT2F, NAS F, GRF, GSTF com um *primer* reverso Âncora e, em uma segunda amplificação com SAT1F-SAT3R e NASF-NASR. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta e fotodocumentado em um sistema EDAS 120, kodak.. Os resultados obtidos foram baseados na análise das bandas amplificadas tendo em vista o tamanho esperado em pares de base.

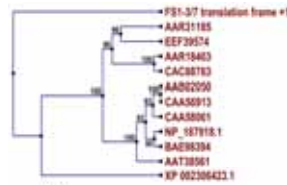
Sequenciamento – os fragmentos amplificados mais intensos foram eluídos do gel com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega, Inc), quantificado e utilizado para clonagem no vetor pCR2.1/ pCRII (Invitrogen, Inc.) e encaminhados para sequenciamento automático



Resultados e Discussão



Coleta da Planta

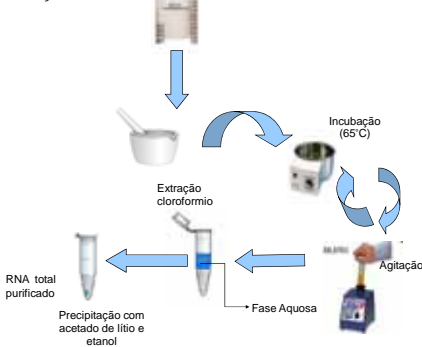


Análise de Bioinformática

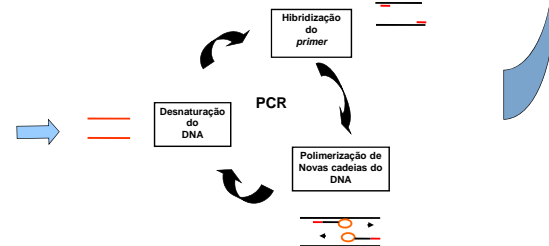
Gel de agarose 1,5%

Figura 1. Plantas hiperacumuladoras coletadas em Barro Alto, GO. A – *H. salicoides*; B – *J. lanstykii*.

Extração do RNA



Síntese da primeira fita de cDNA (RT-PCR)



Conclusões

O protocolo de extração de RNA utilizado foi eficiente para a obtenção dos ácidos nucleicos em quantidade e qualidade para as reações em RT-PCR;

Os *primers* degenerados utilizados foram capazes de amplificar fragmentos gênicos em RT-PCR a partir do cDNA de plantas hiperacumuladoras nativas do Cerrado;

Pelo menos na espécie *Oxalis* spp. foi confirmado um fragmento de transcrito relacionado com a enzima serina acetil transferase (SAT).

Literatura Citada

CORDEIRO, M.C.R.; SILVA, M.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MIRANDA, Z.J.G.; AQUINO, F.G.; FRAGOSO, R.R.; ALMEIDA, J. & ANDRADE, L.R.M. – Brazilian Native Plants Rich in Polyphenolics and Polysaccharides. *Anais do IX Simpósio Nacional do Cerrado e II Simpósio Internacional de Savanas Tropicais*, Brasília 12 a 17 de outubro de 2008.

DINARDI, A.L.; FORMAGLI, V.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G.D.; TONSO, S. & PELEGRINI, R. – Fitorremediação. *III Fórum de Estudos Contábeis*, 2003.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A. & KORBAN, S.S. – RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, p. 437-437, 2004.

KIDD, P.S.; CASTRO, C.B.; LESTÓN, M.G. & MONTERROSO, C. – Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas*, v. 16, p. 26-43, 2007.