

## **Padrão de Expressão de *Alt<sub>SB</sub>*, um Gene de Tolerância ao Alumínio de Efeito Maior em Sorgo**

Ubiraci G.P. Lana, Claudia T. Guimarães, Vera M.C. Alves, Cíntia M. Coelho, Fernanda F. Caniato, Robert E. Schaffert e Jurandir V. Magalhaes. E-mail: jurandir@cnpms.embrapa.br

Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil.

**Palavras-Chave:** Tolerância ao alumínio, *Alt<sub>SB</sub>*, Expressão gênica, *Sorghum bicolor*.

### **INTRODUÇÃO**

Aproximadamente 127 milhões de hectares do cerrado brasileiro aptos para a utilização agrícola são compreendidos por solos ácidos, caracterizados pela elevada toxidez de alumínio e pela baixa fertilidade natural. A toxidez de alumínio pode ser considerada uma das principais limitações ao uso agrícola desses solos, uma vez que inibe de forma drástica o crescimento do sistema radicular, além de causar outras alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas prejudiciais às plantas (Kochian *et al.*, 2004).

Programas de melhoramento genético têm identificado fontes de tolerância ao Al em várias espécies de interesse agrônomo. Entretanto, ainda hoje, os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância a esse estresse são pouco entendidos.

Recentemente, Magalhães *et al.* (2004) mapearam um gene de efeito maior de tolerância ao Al em sorgo, denominado *Alt<sub>SB</sub>*, utilizando uma população F<sub>2:3</sub> derivada do cruzamento entre a linhagem SC283 (tolerante) e BR007B (sensível). Trabalhos posteriores conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, em colaboração com a Universidade de Cornell e a Universidade do Texas A&M, culminaram na identificação e clonagem do gene *Alt<sub>SB</sub>* (Magalhaes *et al.* 2006).

A genética da tolerância ao Al foi avaliada por meio de marcadores STS flanqueando o gene *Alt<sub>SB</sub>* em um painel composto por treze linhagens de sorgo de ampla variabilidade genética, utilizando-se índices de crescimento radicular sob diferentes níveis de Al tóxico. Os resultados sugeriram que a ampla variação nos níveis de tolerância ao Al entre as linhagens foi associada com a existência tanto de variabilidade alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* quanto de genes distintos de tolerância (Caniato, 2005). Com base na caracterização genética desse painel, o presente estudo buscou verificar o papel da expressão gênica como responsável pelos diferentes graus de tolerância conferido por diferentes alelos do gene *Alt<sub>SB</sub>*.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Material Genético e Obtenção de Tecido Vegetal**

Foram utilizadas treze linhagens de sorgo previamente caracterizadas por Caniato (2005), apresentando ampla variabilidade genética e diferentes níveis de tolerância ao alumínio. As linhagens suscetíveis ao alumínio foram BR007B, BR012R e TX642, e aquelas com níveis variáveis de tolerância foram as linhagens 5DX61/6/2, 9DX9/11, 3DX57/1/1/910, SC112-14, SC175-14, SC283, SC549, SC566, IS8577 e CMSXS225.

As sementes foram germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água deionizada por um período de quatro dias em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27 ± 3°C, noturna de 20 ± 3°C e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram então transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas com capacidade para 8,5 litros de solução nutritiva. As plântulas foram

mantidas por 24 h em solução nutritiva completa sem Al (Magnavaca *et al.*, 1987). Após esse período, foi adicionada nova solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém com a adição de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  nos tratamentos contendo Al. A solução foi continuamente aerada durante todo o período experimental. Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Cada genótipo foi representado por 14 plântulas, que foram crescidas na ausência (controle) e na presença de  $\{27\}$   $\mu\text{M}$  Al, onde as chaves denotam a atividade de Al livre determinado com o software GEOCHEM-PC (Parker *et al.*, 1995). Os experimentos foram conduzidos em blocos totalmente casualizados, utilizando-se três repetições. Foram coletados ápices radiculares de dez plântulas cultivadas por três dias sob estresse de alumínio ou na condição controle. Para isso, 1 cm da raiz, medido a partir do ápice, foi removido com o auxílio de bisturi. O tecido vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e conservado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **Extração e quantificação do RNA total**

As amostras de RNA foram extraídas com o “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante. Ao final do procedimento as amostras foram eluídas em 35  $\mu\text{L}$  de água DEPC.

Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do RNA foi diluída com 4  $\mu\text{L}$  de água DEPC e tratada com 1  $\mu\text{L}$  de DNase I  $10\text{ U mL}^{-1}$  (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) por 15 minutos a temperatura ambiente. Para quantificação do RNA total utilizou-se de 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra tratada acrescidos de 398  $\mu\text{L}$  de água DEPC. A pureza e a concentração do RNA foram determinadas através da leitura das amostras em comprimento de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se o espectrofotômetro Lambda Bio (Perkin Elmer, Wellesley, MA). A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) contendo 0,25  $\text{mg L}^{-1}$  de brometo de etídio. Após a eletroforese realizada a 200V durante trinta minutos, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

### **RT-PCR Semi-Quantitativo**

Para a síntese do DNA complementar foram utilizados 300 ng de RNA total, previamente tratados com DNase I, 500  $\mu\text{g}$  de oligo (dT)<sub>12-18</sub> e 100  $\mu\text{mol}$  de cada dNTP num volume total de 12  $\mu\text{L}$ . As amostras foram aquecidas a  $65^\circ\text{C}$  por 5 minutos e transferidas para gelo. A seguir, foram adicionados 4  $\mu\text{L}$  de tampão 5x (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  e 1  $\mu\text{L}$  de água DEPC. A mistura foi incubada a  $42^\circ\text{C}$  por 2 minutos, adicionando-se a seguir 1  $\mu\text{L}$  de “SuperScript II RT” (Invitrogen, Carlsbad, CA) e mantida a  $42^\circ\text{C}$  por 90 minutos. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a  $70^\circ\text{C}$  por 15 minutos e armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

Foram construídos pares de iniciadores específicos para o gene *Alt<sub>SB</sub>* e para o gene da  *$\beta$ -actina*, que foi utilizado como controle interno. As reações de PCR para a amplificação do cDNA foram padronizadas visando estabelecer o número ideal de ciclos para a avaliação dos fragmentos. Foram testados de 24 a 42 ciclos com incrementos de 2 ciclos para ambos os genes. Após definição do número ideal de ciclos, as reações de PCR foram preparadas em multiplex para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , consistindo de 2  $\mu\text{L}$  de cDNA; 20  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,4); 50  $\text{mmol L}^{-1}$  KCl; 2  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,125  $\text{mmol L}^{-1}$  dNTPs e 10 pmoles de cada iniciador. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a  $94^\circ\text{C}$  por 1 min, ciclos de  $94^\circ\text{C}$  por 30s,  $60^\circ\text{C}$  por 40s e  $72^\circ\text{C}$  por 90s, elongação final a  $72^\circ\text{C}$  por 5 min, mantendo a reação à  $4^\circ\text{C}$ .

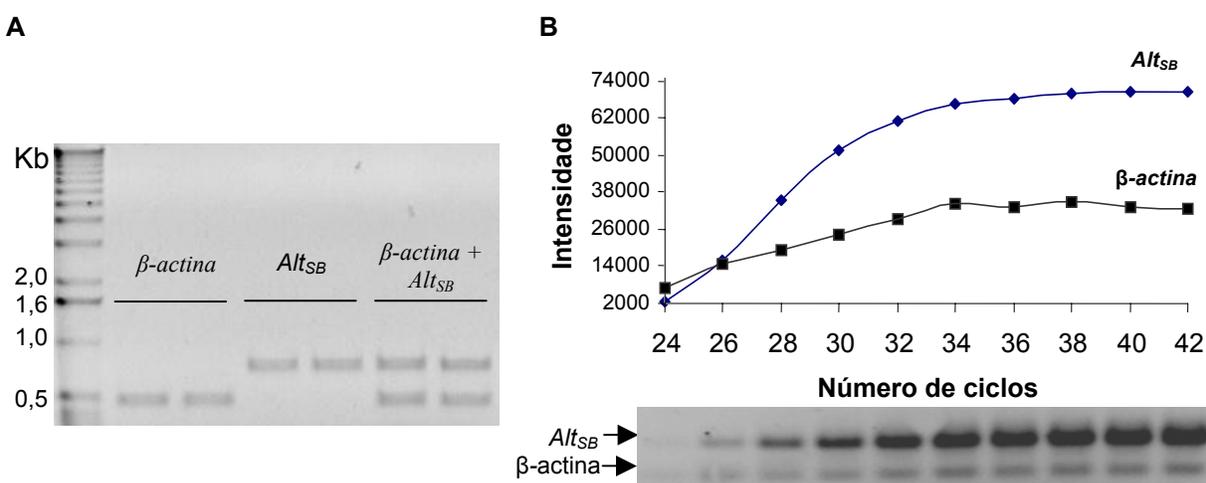
Ao produto da PCR, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de corante (0,15% (m/v) azul de bromofenol, 0,15% (m/v) xileno cianol, 50  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8,0; 5  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA pH 8,0; 50% (v/v) glicerol e 0,5% (m/v) SDS), sendo toda a mistura aplicada em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE (40  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris-acetato; 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100V durante duas horas, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os produtos de amplificação de cada amostra foram quantificados utilizando-se do programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Com o objetivo de normalizar os dados de expressão, adotou-se a razão entre a intensidade do produto amplificado do gene *Alt<sub>SB</sub>* e a intensidade da  *$\beta$ -actina*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de significância. A análise de correlação foi realizada entre os dados de expressão e dados de crescimento radicular previamente obtidos por Caniato (2005).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pares de iniciadores para os genes avaliados foram desenhados flanqueando íntrons, com o objetivo de identificar uma possível contaminação com DNA genômico, onde produtos de tamanho superior ao esperado seriam obtidos. Durante a reação de PCR há uma relação linear entre o número de ciclos e a quantidade de DNA produzida. No entanto, quando atingido um determinado número de ciclos a quantidade de DNA formada entra na fase estacionária, o que acontece como resultado da perda de estabilidade da enzima, pela depleção de nucleotídeos, iniciadores, entre outros constituintes presentes na reação. Assim, a análise semi-quantitativa deve ser realizada na condição de amplificação ainda na fase linear.

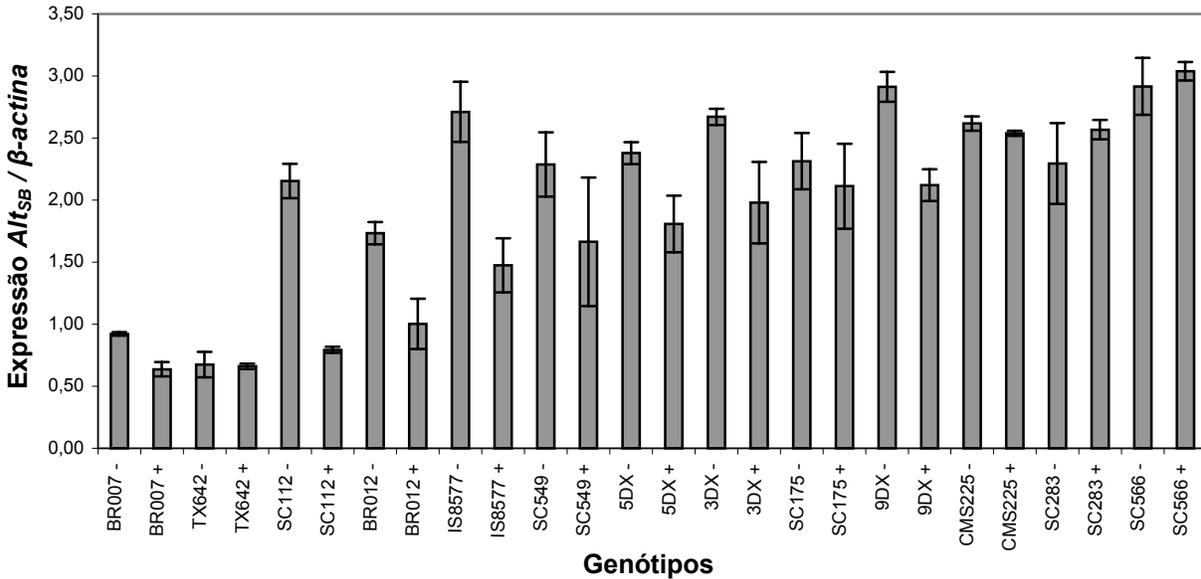
Após a otimização das condições do RT-PCR semi-quantitativo em multiplex (Figura 1A), o número de ciclos selecionado para a determinação semi-quantitativa foi igual a 30 (Figura 1B).



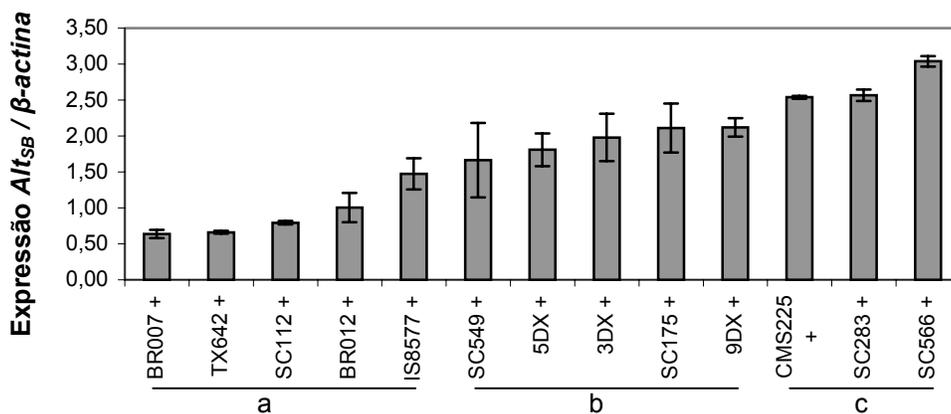
**Figura 1.** Padronização das condições de RT-PCR semi-quantitativo dos genes *Alt<sub>SB</sub>* e  *$\beta$ -actina*, este último utilizado como controle constitutivo. A) Otimização da reação multiplex. B) Curva de amplificação para determinação do número de ciclos de PCR para análise semi-quantitativa.

Os valores da expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* avaliados na presença e ausência de alumínio, apresentaram grande variabilidade entre os treze genótipos (Figura 2). Em várias

linhagens, a expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* foi reprimida na presença do alumínio quando comparados com a condição controle, sendo os efeitos mais pronunciados nas linhagens SC112-14, BR012R e IS8577. Nas linhagens onde o gene *Alt<sub>SB</sub>* apresentou maiores níveis de expressão na presença do estresse, não houve diferença significativa em relação à condição controle, sugerindo que nessas linhagens o gene não foi diferencialmente expresso (CMSXS225, SC283 e SC566).



**Figura 2.** Expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* em genótipos de sorgo na ausência e presença de alumínio {27  $\mu\text{mol L}^{-1}$ } submetidos a três dias de tratamento. Os valores representam a média de três repetições.



**Figura 3.** Expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* em genótipos de sorgo na presença de alumínio {27  $\mu\text{mol/L}$ } submetidos a três dias de tratamento. Médias com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores representam médias de três repetições. A análise de variância dos valores de expressão relativa e a comparação entre grupos de médias pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade foram realizadas para as

linhagens na atividade de  $\{27\}$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  de alumínio em solução nutritiva. Três grupos puderam ser observados: a) o primeiro caracterizado pela expressão reduzida, composto pelas linhagens BR007B, TX642, SC112-14, BR012R e IS8577; b) o segundo grupo, caracterizado por uma expressão intermediária, representada pelos genótipos SC549, 5DX61/6/2, 3DX57/1/1/910, SC175-14 e 9DX9/11; c) um grupo apresentando os genótipos com os maiores níveis de expressão, composto por CMSXS225, SC283 e SC566 (Figura 3).

A tolerância ao alumínio de todas as treze linhagens foi previamente caracterizada através do crescimento líquido relativo em solução nutritiva (Caniato, 2005). Observou-se uma correlação igual a 0,95 entre os dados de expressão gênica do *Alt<sub>SB</sub>* e os dados de comprimento radicular na presença de alumínio. Esta alta correlação num painel de sorgo com ampla variabilidade genética sugere que o gene *Alt<sub>SB</sub>* apresenta-se como o principal gene de tolerância ao alumínio em sorgo. Em trigo, espécie na qual o principal gene de tolerância é denominado *ALMT-1*, um padrão semelhante foi encontrado na análise de genótipos com extensa diversidade genética e diferentes graus de tolerância ao Al. Tal gene, mapeado no cromossomo 4 de trigo, não é ortólogo ao gene *Alt<sub>SB</sub>*, localizado no cromossomo 3 em sorgo (Raman et al., 2005).

Assim, esses resultados indicam que a tolerância ao alumínio neste painel de sorgo é primariamente condicionada pelo nível de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*.

#### 4. Literatura Citada

CANIATO, F. F. **Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa. 75 p. 2005.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

MAGALHAES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Maryland, v. 167, p. 1905-1914, 2004.

MAGALHAES, J.V.; LIU, J.; GUIMARES, C.T.; ALVES, V.M.; LANA, U.G.P.; WANG, Y-H; COELHO, C.M.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.A.; KLEIN, P.E.; AND LV KOCHIAN. Positional cloning and characterization of *Alt<sub>SB</sub>*: A novel membrane transporter and major aluminum tolerance gene in Sorghum bicolor. 2006 (In preparation).

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201- 212.

PARKER, D. R.; NORVELL, W. A.; CHANEY, R. L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R. H., et al. (Ed.) **Chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p. 253-269.

RAMAN, H., ZHANG, K., CAKIR, M., APPELS, R., GARVIN, D.F., MARON, L.G., KOCHIAN, L.V., MORONI, J.S., RAMAN, R., IMTIAZ, M., DRAKE-BROCKMAN, F., WATERS, I., MARTIN, P., SASAKI, T., YAMAMOTO, Y., MATSUMOTO, H., HEBB, D.M., DELHAIZE, E. AND RYAN, P.R.. Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, 48, 781-791, 2005.