

## Caracterização Molecular do Gene *SbMATE*, Principal Responsável pela Tolerância ao Alumínio em Sorgo

Ubiraci G. P. Lana <sup>1</sup>, Claudia T. Guimarães <sup>1</sup>, Vera M. C. Alves <sup>1</sup>, Robert E. Schaffert <sup>1</sup>, Leon V. Kochian <sup>2</sup> e Jurandir V. Magalhães <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG 35701-970.

<sup>2</sup> U.S. Plant and Soil Nutrition Laboratory, Cornell University, USA.

Palavras-chave: Tolerância ao Al, *Sorghum bicolor*, *SbMATE*.

No Brasil, uma das principais limitações à produção vegetal é a toxidez do alumínio (Al). O desenvolvimento de genótipos tolerantes ao alumínio requer a identificação tanto de genes quanto de alelos que possuam efeitos superiores na expressão da tolerância. Nesse sentido, vários esforços têm sido direcionados para aumentar o conhecimento acerca da tolerância ao Al em sorgo. Um gene que explica 80% da variação fenotípica da tolerância ao alumínio foi mapeado na região terminal do cromossomo 3 de sorgo por Magalhães et al. (2004), sendo denominado *Alt<sub>SB</sub>*. Utilizando marcadores que flanqueiam o gene *Alt<sub>SB</sub>* em populações derivadas do cruzamento de 11 linhagens de sorgo com amplo espectro de tolerância ao alumínio com uma linhagem sensível (BR012), Caniato et al. (2007) constataram a existência de diferentes alelos no loco *Alt<sub>SB</sub>*, além de novos genes envolvidos na tolerância ao Al. O gene *Alt<sub>SB</sub>* foi isolado por meio da estratégia de clonagem baseada em mapa e codifica um membro de uma família de transportadores de membrana (*SbMATE*), responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo (Magalhães et al., 2007). Com base na seqüência do gene *SbMATE* torna-se fundamental estudar e caracterizar o(s) mecanismo(s) que controlam a variabilidade alélica nesse loco. Assim, o presente trabalho objetivou o estudo da estrutura e da expressão do gene *SbMATE* entre linhagens de sorgo com ampla variabilidade para a tolerância ao alumínio.

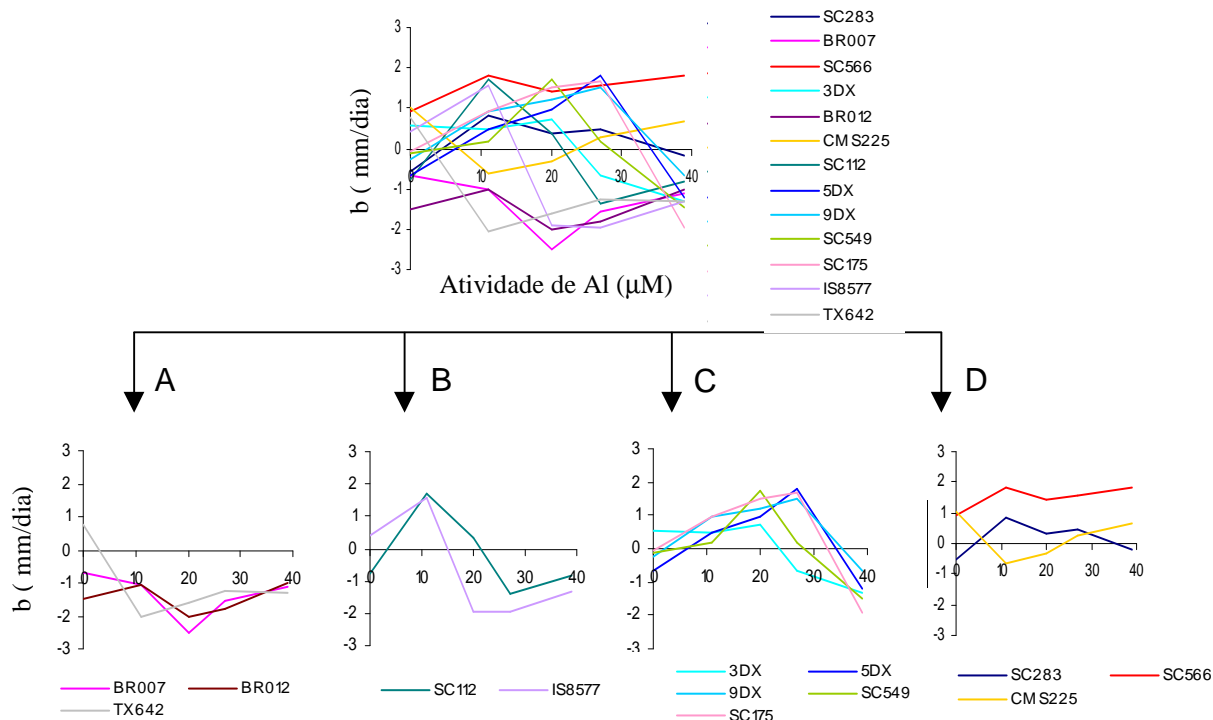
Foram utilizadas as 12 linhagens de sorgo previamente caracterizadas por Caniato et al. (2007), denominadas BR007B, BR012R, 5DX61/6/2, 9DX9/11, 3DX57/1/1/910, SC112-14, SC175-14, SC283, SC549, SC566, IS8577, CMSXS225R; além do genótipo BTx642, que fazem parte do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo. As sementes foram germinadas segundo Caniato et al. (2007) e os experimentos conduzidos com cinco atividades de Al: {0}, {11}, {20}, {27} e {39}  $\mu$ M. Para obtenção de uma curva de resposta ao Al ao longo de um período de seis dias, calculou-se a taxa de crescimento radicular (mm/dia) a partir das inclinações das curvas de crescimento em cada atividade de Al ao longo do tempo. As curvas foram agrupadas por meio do algoritmo HaiNet.

Para o seqüenciamento do gene *SbMATE* foram utilizados iniciadores segundo Magalhães et al. (2007). Os fragmentos foram purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA) e seqüenciados com kit “Big Dye Terminator v3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram analisadas no seqüenciador ABI3100 (Applied Biosystems), a qualidade das seqüências avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as seqüências selecionadas foram alinhadas pelo programa ClustalW.

Visando a análise de expressão do gene *SbMATE*, foram cultivadas plântulas de cada um dos 13 genótipos de sorgo na ausência e na presença de {27}  $\mu\text{M}$  de Al. O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Foram coletados ápices radiculares (1 cm) de dez plântulas cultivadas por três dias sob estresse de Al ou na condição controle. As amostras de RNA foram extraídas com o “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, CA). Para a síntese do DNA complementar utilizou-se do kit de “SuperScript II RT” (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os iniciadores utilizados para amplificar o gene *SbMATE* foram: JL57 (5’ GTGCTGGATCCGATCCTGAT 3’) e JL58 (5’ CACTGCCGAAGAACTTCCA 3’). Já para o gene controle,  $\beta$ -actina, foram utilizados os primers ActR (5’ GATCCACATCTGTTGGAACG 3’) e ActF (5’ TGATGAAGATTCTCACTGAG 3’).

Após definição dos ciclos de amplificação do PCR semi-quantitativo, as condições da reação em multiplex foram realizadas em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , consistindo de 2  $\mu\text{L}$  de cDNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,125 mM dNTPs e 10 pmols de cada iniciador. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 90 segundos, elongação final a 72°C por 5 minutos, mantendo a reação à 4°C. Os produtos foram quantificados utilizando-se do programa “ImageQuant” (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Os dados de expressão do gene *SbMATE* foram normalizados utilizando a razão entre as intensidades dos produtos do gene e da  $\beta$ -actina.

O agrupamento das curvas de crescimento permitiu a caracterização das linhagens em quatro grupos distintos (Figura 1).



**Figura 1.** Agrupamento das curvas de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na ausência e presença de diferentes atividades de Al. O valor b representa a inclinação das curvas de crescimento radicular ao longo de seis dias.

No grupo A, as linhagens BR007, Tx642 e BR012 tiveram o crescimento radicular inibido à {11}  $\mu\text{M}$  de Al, caracterizadas como sensíveis. As linhagens SC112 e IS8577, pertencentes ao grupo B, mostraram uma indução no crescimento radicular até a atividade de 11  $\mu\text{M}$  de Al, a partir da qual foi observada uma inibição no crescimento, com uma drástica redução à {20}  $\mu\text{M}$  de Al. Essas linhagens podem ser consideradas moderadamente tolerantes. No grupo C foram incluídas as linhagens 3DX, SC175, SC549, 9DX e 5DX, que apresentaram um aumento da taxa de crescimento radicular até as atividades de 20  $\mu\text{M}$  (3DX e SC549) ou 27  $\mu\text{M}$  de Al (SC175, 5DX e 9DX), a partir das quais houve uma acentuada inibição no crescimento radicular. Esse grupo foi considerado tolerante. As linhagens CMS225, SC283 e SC566, agrupadas em D, apresentaram taxas de crescimento praticamente constantes até a atividade de 39  $\mu\text{M}$  de Al, novamente demonstrando uma tolerância superior em relação às demais linhagens. Enquanto as linhagens sensíveis não apresentaram nenhum tipo de indução, as linhagens moderadamente tolerantes mostraram um comportamento indutivo ao longo das atividades de Al. Já as linhagens tolerantes mostraram uma indução no crescimento radicular ao longo do tempo e das atividades de Al. As linhagens altamente tolerantes (CMS225, SC283 e SC566) apresentaram um comportamento indutivo ao longo do tempo e taxas de crescimento constantes nas diferentes doses de alumínio. A existência de duas respostas indutivas distintas verificadas entre as linhagens pode indicar a atuação de diferentes mecanismos no controle da tolerância ao alumínio.

O alinhamento das seqüências do gene *SbMATE* revelou um reduzido número de polimorfismos na região codificadora entre as linhagens de sorgo. Onze dos treze genótipos não apresentaram variação na seqüência de nucleotídeos do gene, incluindo desde linhagens sensíveis como BR007 até linhagens altamente tolerantes como SC283. Um dos polimorfismos encontrados foi na linhagem SC566, onde houve uma única substituição de timina (T) por adenina (A) no primeiro éxon do gene. Uma notável exceção foi observada na linhagem Tx642, que apresentou uma grande quantidade de polimorfismos ao longo do gene, incluindo substituições de nucleotídeos únicos (SNPs), inserções e deleções.

Assim, a variabilidade na tolerância ao Al verificada entre as treze linhagens de sorgo não pôde ser explicada pelas variações estruturais na seqüência do gene *SbMATE*, uma vez que tanto linhagens altamente tolerantes quanto sensíveis apresentaram o mesmo haplótipo. A mutação observada no haplótipo da linhagem SC566 resultou na troca do aminoácido leucina pela histidina, localizada no quarto domínio transmembrânico. Apesar de a troca ter ocorrido entre um aminoácido hidrofóbico por um hidrofílico, a estrutura secundária predita da proteína não sofreu alteração significativa. Já os polimorfismos da linhagem Tx642 ocasionaram uma mudança da matriz de leitura, resultando no aparecimento de um códon de terminação prematuro, e consequentemente em uma proteína predita de apenas 241 aminoácidos sem oito domínios.

A expressão relativa do gene *SbMATE* possibilitou a classificação das linhagens em quatro grupos pelo teste de Scott-Knot a 5%. As linhagens BR007, Tx642, SC112 e BR012 apresentaram uma baixa expressão do gene *SbMATE* e, com exceção da SC112, foram classificadas como sensíveis ao Al. As linhagens SC112 e IS8577 apresentaram padrões de crescimento radicular muito parecidos e foram classificadas como moderadamente tolerantes. Apesar de ambas as linhagens serem igualmente classificadas com relação à tolerância ao Al, a expressão do *SbMATE* em SC112 foi duas vezes menor que na linhagem IS8577. O padrão de expressão desse gene na linhagem SC112 corrobora com os dados de Caniato et al. (2007) que demonstraram que a tolerância ao Al nessa linhagem não é controlada por esse gene. As

linhagens SC549, 3DX, 5DX, 9DX e SC175 apresentaram uma expressão intermediária do gene *SbMATE* e foram classificadas como tolerantes ao Al. Dentre essas linhagens, 3DX e 5DX apresentam uma similaridade genética de 100% considerando resultados de quinze marcadores microsatélites (Caniato et al., 2007). Apesar de ambas terem sido agrupadas como tolerantes, a superioridade na tolerância ao Al de 5DX em comparação com 3DX é ressaltada pela taxa de crescimento (Figura 1). Caniato et al., (2007) sugerem que a maior tolerância da 5DX pode ser advinda da introgressão de genes diferentes do *SbMATE*. As evidências apresentadas suportam essa hipótese, uma vez que os níveis de expressão do gene *SbMATE* na presença do Al nessas linhagens foram muito similares, sugerindo que herdaram o mesmo alelo. Assim, a maior tolerância ao Al da linhagem 5DX seria realmente conferida por gene(s) distinto(s) ao *SbMATE*.

As linhagens CMS225, SC283 e SC566 apresentaram os maiores níveis de expressão do *SbMATE* e foram consideradas altamente tolerantes ao Al de acordo com a taxa de crescimento radicular. A linhagem SC283 é um padrão de tolerância ao Al, sendo utilizada como fonte para a clonagem do gene *SbMATE* (Magalhães et al., 2007). Mesmo tendo sido agrupada juntamente com CMS225 e SC283, a linhagem SC566 apresentou um maior crescimento radicular sob estresse de alumínio. Tal tolerância pode estar relacionada tanto à maior expressão do gene *SbMATE* na presença do alumínio quanto à mutação não-sinônima no primeiro éxon, que alterou um aminoácido no quarto domínio transmembrânico da proteína predita. Como resultado, a linhagem poderia ter um transportador de membrana mais eficiente e/ou um maior número deles.

A correlação de 0,9511 ( $p < 0,0001$ ) entre a expressão relativa do gene *SbMATE* e o crescimento líquido relativo da raiz seminal à  $\{27\}$   $\mu\text{M}$  de Al obtido por Caniato et al. (2007), sugere que a tolerância ao alumínio em sorgo é primariamente condicionada pelo nível de expressão do gene *SbMATE*. Assim, a variação alélica no loco *SbMATE* associada aos diferentes níveis de tolerância ao alumínio, encontrada por Caniato et al. (2007), poderia ser explicada pelos níveis de expressão desse gene. A regulação da expressão do gene *SbMATE* parece ser o ponto chave do processo de tolerância ao Al em sorgo, de maneira que a diversidade alélica previamente identificada no loco *SbMATE* pode estar relacionada a variantes envolvidos no controle transcricional. Assim, estudos envolvendo a caracterização da região promotora do gene *SbMATE* podem permitir um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios associados ao diferentes níveis de tolerância ao alumínio em sorgo.

## Referências bibliográficas

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHÃES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p. 863-876, 2007.

MAGALHÃES, 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**, v.167, p.1905-1914, 2004.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M.; WANG, Y-H; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; KLEIN, P.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, C. M.; TRICK, H.N.; KOCHIAN, L. V. A gene in multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature genetics**, v.39, p.1156-1161, 2007.