

180

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Dezembro, 2012

Autores

Jurandir Vieira Magalhães

Eng.-Agr., Ph.D. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br

Janaina de Oliveira Melo

Bioquímica, D.Sc. em Genética Molecular, Bolsista CNPq na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, janainabqj@yahoo.com.br

Ubiraci G. de Paula Lana

Químico, M.Sc. em Biologia Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, ubiraci.lana@embrapa.br

Vera Maria Carvalho Alves

Eng.-Agr., Ph.D. em Nutrição Mineral, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, vera.alves@embrapa.br

Claudia T. Guimarães

Eng.-Agr., D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

Robert Eugene Schaffert

Eng.-Agr., Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, robert.schaffert@embrapa.br

Embrapa

Efeitos de Background Genético para a Tolerância ao Alumínio em Sorgo

A Tolerância ao Al em sorgo

Solos sujeitos ao intemperismo intenso, como é o caso dos solos tropicais, apresentam frequentemente pH baixo. Nessas condições, o alumínio (Al), um constituinte natural da fração argila desses solos, assume formas iônicas solúveis na solução do solo. Em consequência, a toxidez causada pelo alumínio em solos ácidos danifica o sistema radicular de plantas sensíveis e restringe a absorção de água e de nutrientes. Portanto, a toxidez causada pelo Al leva à redução da produção vegetal em solos ácidos, que estão amplamente distribuídos no mundo (UEXKÜLL; MUTERT, 1995).

Um dos principais mecanismos fisiológicos de tolerância ao Al envolve a liberação de ácidos orgânicos ativada por Al, por meio de transportadores localizados na membrana plasmática das células dos ápices radiculares (DELHAIZE et al., 2007). Uma vez liberados na rizosfera, esses ácidos orgânicos formam compostos estáveis e não tóxicos com o Al, assim conferindo tolerância ao metal (MA et al., 2001; KOCHIAN et al., 2004). O primeiro gene de tolerância ao Al isolado em plantas foi o gene *TaALMT1*, que codifica um transportador responsável pela exsudação de malato ativada por Al em ápices radiculares de trigo (SASAKI et al., 2004). Posteriormente, membros da família multigênica MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*) foram isolados em cevada (*HvAACT1*, FURUKAWA et al., 2007) e sorgo (*SbMATE*, MAGALHÃES et al., 2007). Diferentemente do gene *TaALMT1* em trigo, os genes da família MATE conferem tolerância ao Al via exsudação de citrato ativada pelo Al. O gene *SbMATE* confere tolerância ao Al em sorgo via o loco *Alt_{SB}*, que foi mapeado no cromossomo 3 de sorgo por Magalhães et al. (2004).

Ainda que o loco *Alt_{SB}* esteja associado com um efeito fenotípico acentuado na tolerância ao Al, possíveis efeitos de *background* genético podem reduzir a eficácia de programas de melhoramento molecular baseados somente nesse loco de tolerância. De fato, efeitos de *background* genético para a tolerância ao Al foram relatados na literatura (revisado por MAGALHÃES, 2006). Por exemplo, Johnson et al. (1997) observaram transferência incompleta da tolerância ao Al para linhagens semi-isogênicas (*near isogenic lines* ou ISOs) de trigo. Os autores sugeriram que isso pode dever-se à perda de genes distintos do gene introgridido ou a menor expressão da tolerância devido a um efeito de *background* genético no parental recorrente. Efeitos de *background* genético também foram observados para o gene *AtALMT1*, um homólogo de Arabidopsis do gene *TaALMT1* (HOEKENGA et al., 2006).

Considerando que possíveis efeitos de *background* genético podem reduzir a eficiência de programas de seleção assistida com base somente no loco *Alt_{SB}*, esse trabalho teve como objetivo estudar a possível ocorrência desses eventos em sorgo. Para isso, o loco *Alt_{SB}* de diferentes fontes doadoras foi introgridido por seleção assistida por marcadores em um *background* genético comum, sensível ao Al, pertencente à linhagem de sorgo BR012. Os resultados desse trabalho foram publicados na revista *the Plant Journal* (MELO et al., 2012).

Obtenção dos estoques genéticos

Linhagens semi-isogênicas (ISO) foram obtidas por retrocruzamento assistido por marcadores de maneira a introgridir o loco Alt_{SB} proveniente de diferentes doadores, utilizando-se a linhagem sensível, BR012, como parental recorrente comum. Linhagens semi-isogênicas $RC_3(F_{3-8})$, fixadas para os diferentes alelos doadores, foram geradas com seleção *foreground* (marcadores S17, S73, CTG29 e M181). Em resumo, como esses marcadores estão fortemente ligados física e geneticamente ao loco Alt_{SB} (CANIATO et al., 2007, 2011), eventos de recombinação não são esperados considerando os tamanhos populacionais adotados. De fato, amplicons cobrindo regiões polimórficas entre os parentais foram sequenciados e os resultados confirmaram a fixação dos alelos doadores nas ISOs.

Análise de tolerância ao alumínio nas linhagens parentais e nas linhagens isogênicas

O painel de sorgo foi também fenotipado para a tolerância ao Al em solução nutritiva seguindo-se os procedimentos descritos em Caniato et al. (2007, 2011), utilizando-se $27 \mu\text{M Al}^{3+}$ de atividade livre de Al em solução nutritiva. O Crescimento Líquido Relativo (CLR) foi calculado pela razão entre o crescimento radicular líquido obtido em solução nutritiva sob estresse de Al e o crescimento líquido na ausência de Al, considerando-se um período de 5 dias. Os valores foram expressos como porcentagem, considerando-se o crescimento do tratamento controle.

Análise de expressão do gene *SbMATE* em linhagens parentais e semi-isogênicas

Plântulas de sorgo foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 e $27 \mu\text{M Al}^{3+}$ de atividade de Al. Resumidamente, as sementes foram esterilizadas com 0.525% NaOCl e lavadas com água destilada. Após três dias de germinação, as plântulas foram transferidas para copos de polietileno colocados em bandejas contendo 8 L de solução nutritiva sem Al (pH 4,0) sob aeração, em câmara de crescimento com temperaturas diurnas e noturnas de 27 e 20 °C, respectivamente, intensidade luminosa de $330 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoperíodo de 12 h.

Após 24 h, a solução nutritiva foi substituída por solução contendo $27 \mu\text{M Al}^{3+}$. Após 5 dias de exposição ao Al, o primeiro centímetro de 21 ápices radiculares de cada genótipo foram coletados e imediatamente congelados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. O RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen), segundo recomendações do fabricante, adicionando-se 10U da enzima DNase I, RNase-free (Qiagen), com 15 min de incubação à temperatura ambiente. A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) para um volume final de 20 μL , utilizando 2 μg de RNA total, RT *Random primers* e Transcriptase Reversa, conforme instruções do fabricante. A reação de síntese procedeu-se a 25 °C por 10 min, 37 °C por 2 h e 85 °C por 5 min.

A expressão do gene *SbMATE* foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo no equipamento ABI Prism 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando o kit TaqMan Gene Expression (Applied Biosystems), com a sonda desenhada para hibridização na junção entre os exons 3 e 4, em região monomórfica do gene *SbMATE*. Diluições seriadas foram feitas para obtenção da curva padrão para *SbMATE* e para RNA ribossomal 18S, utilizado como controle endógeno. As diluições de cDNA que correspondem a 10 ng para analisar a expressão de *SbMATE* e 0,01 ng para 18S foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real, pois corresponderam a valores de CT intermediário, dentro da faixa dinâmica de PCR em tempo real recomendada pelos fabricantes. As sequências dos primers e da sonda utilizados são: *primers forward* (F): 5'-CAGCCATTGCCCATGTTCTTT-3', *reverse* (R): 5'-ACCAGCTTGCTCAGCATTATCA-3' e sonda: 6FAM CCCAGTACCTGATAACGC TAMRA. A expressão endógena foi quantificada com o controle interno 18S RNA utilizando o TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems). A quantificação relativa foi calculada usando o método CT comparativo, denominado $\Delta\Delta\text{CT}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), sendo adotadas três repetições técnicas nos experimentos.

Redução da tolerância ao alumínio nas linhagens semi-isogênicas em comparação com as parentais

A tolerância ao Al foi avaliada nas linhagens parentais e nas linhagens semi-isogênicas (ISO), nas quais somente o loco Alt_{SB} foi introgridido por seleção assistida por marcadores. As duas linhagens com maior tolerância ao Al foram SC283 e SC566. Trabalhos anteriores com

atividades mais elevadas de Al indicaram que a linhagem SC566 é uma das mais tolerantes ao Al em um painel de sorgo com aproximadamente 260 linhagens (CANIATO et al., 2011). De maneira interessante, a tolerância ao Al foi menor nas ISOs em comparação com as linhagens parentais em todos os casos. A redução de tolerância foi diferencial, dependendo da linhagem doadora utilizada para introgressão. As maiores taxas de redução foram observadas na ISO 3DX, de aproximadamente 70%, seguida das ISOs SC175 (~50%) e CMS225 (40%). Entretanto, as ISOs derivadas das linhagens altamente tolerantes, SC566 e SC283, foram somente 20% menos tolerantes do que as linhagens parentais, indicando retenção significativa da tolerância ao Al nesses casos.

Redução diferencial da expressão do gene *SbMATE* nas linhagens semi-isogênicas

A Figura 2 mostra que a exposição ao Al induziu a expressão do gene *SbMATE* particularmente nas linhagens tolerantes, CMS225, SC283 e SC566. Em outras linhagens, o Al inibiu a expressão do gene *SbMATE*. De forma coincidente com o anteriormente observado para a tolerância ao Al, a expressão do gene *SbMATE* foi sempre mais baixa nas ISOs em comparação às linhagens parentais. Comparando-se linhagens parentais e as ISOs, a redução mais acentuada, de aproximadamente 80%, foi observada na ISO 3DX, resultando em um baixo nível de expressão comparável àquele observado nas linhagens sensíveis. Em contrapartida,

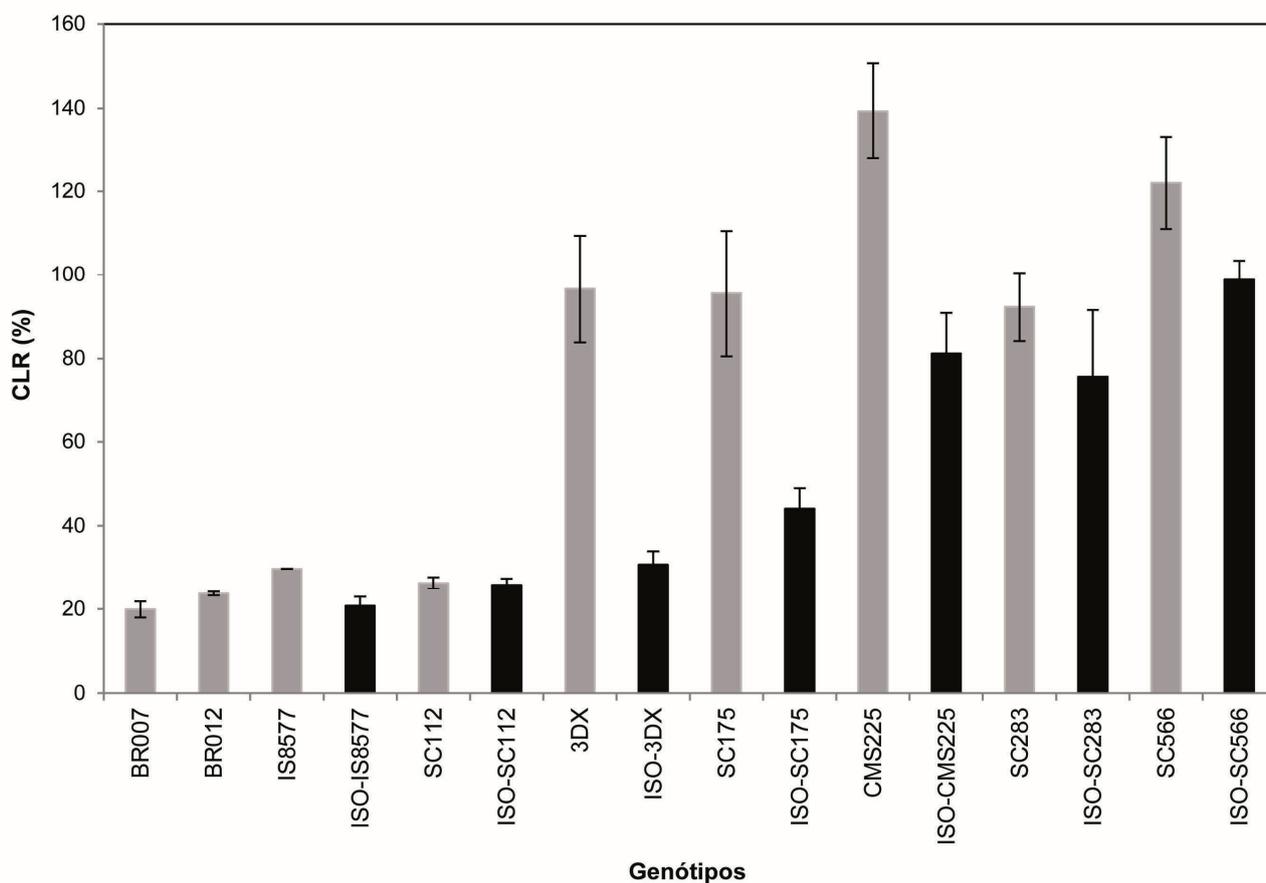


Figura 1. Tolerância ao Al em linhagens e linhagens semi-isogênicas (ISO) portando diferentes alelos no loco *Alf_{SB}*. As linhagens padrões sensível e tolerante ao Al, BR007 e SC283, estão incluídas. O crescimento líquido relativo (CLR) foi obtido pela razão entre crescimento líquido na presença de Al e crescimento líquido na ausência de Al, em um período de 5 dias em solução nutritiva pH 4,0 contendo 27 μM Al^{3+} . Barras verticais indicam o erro padrão da média.

ainda que reduzida com relação aos parentais, a expressão do gene *SbMATE* nas ISOs derivadas de CMS225, SC283 e SC566 foi ainda 25, 60 e 70 vezes aquela observada na linhagem sensível, BR012, respectivamente. Os resultados indicam que a retenção da tolerância ao Al nessas ISOs está associada com a alta expressão do gene *SbMATE* dos alelos doadores e uma maior manutenção da expressão nas linhagens semi-isogênicas.

ISOs derivadas das linhagens SC283 e SC566 serem altamente tolerantes ao Al sugere que esses genes adicionais têm um impacto reduzido na tolerância ao Al, pelo menos em fontes altamente tolerantes.

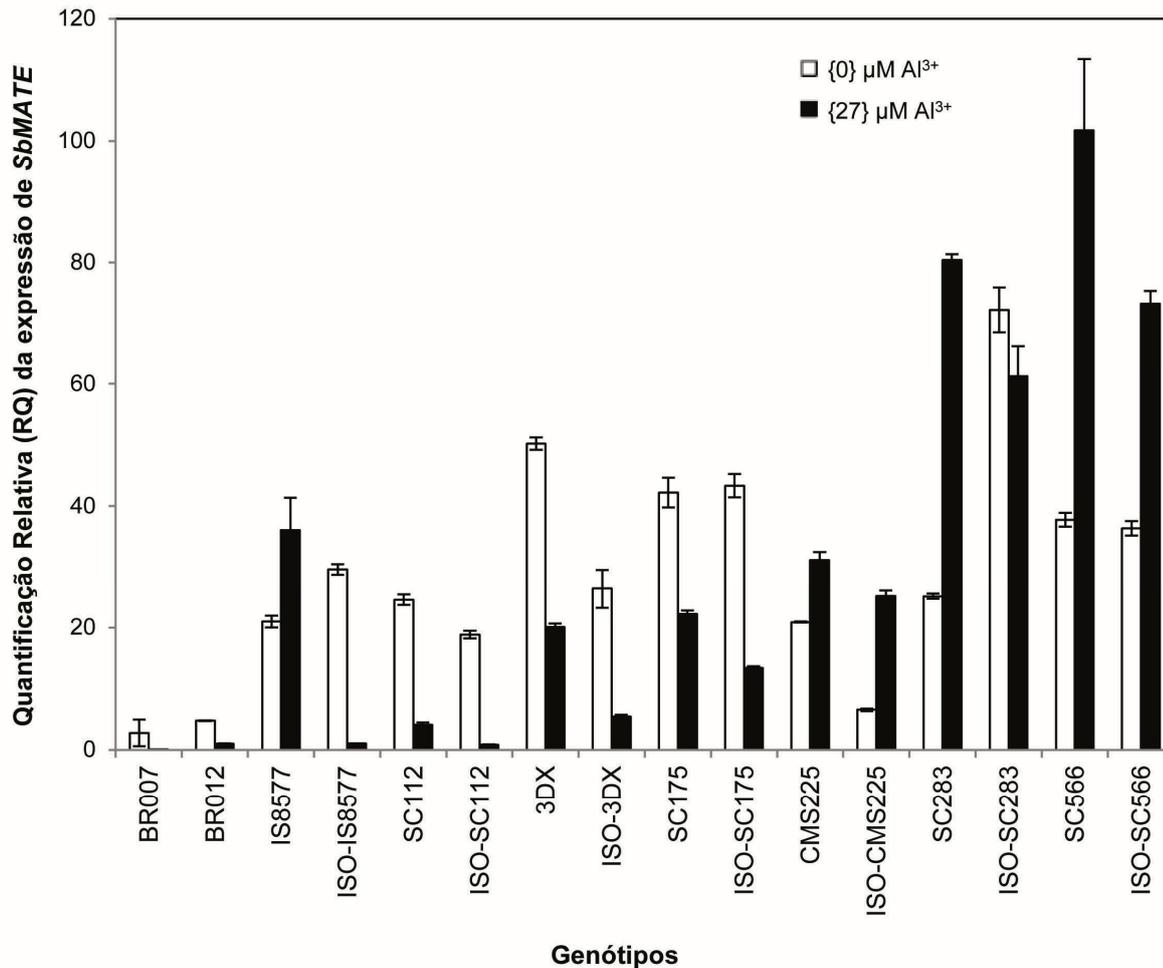


Figura 2. Perfil de expressão do gene *SbMATE* em linhagens e linhagens semi-isogênicas (ISO) cultivadas em solução nutritiva pH 4,0 com 27 μM Al³⁺ ou na ausência de Al. As linhagens padrões sensível e tolerante ao Al, BR007 e SC283, estão incluídas. A expressão na linhagem sensível, BR012, tratada com Al, foi utilizada como referência.

A tolerância ao Al foi moderadamente correlacionada com a expressão do gene *SbMATE* nas linhagens de sorgo (Figura 3a). Entretanto, a mesma análise com um *background* genético comum, conduzida nas ISOs, resultou em um aumento significativo da correlação entre expressão do gene *SbMATE* e tolerância ao Al (Figura 3b). Como relatado anteriormente, genes distintos do gene *SbMATE* contribuem para a tolerância ao Al nas linhagens parentais (CANIATO et al., 2007). Entretanto, o fato de as

Estrutura genômica do gene *SbMATE*

A Figura 4 mostra polimorfismos no gene *SbMATE* em diferentes linhagens de sorgo. Nota-se uma ausência quase completa de polimorfismos na região codificadora do gene *SbMATE*, com a exceção de um único SNP observado na linhagem altamente tolerante, SC566, e várias inserções e deleções na linhagem sensível, Tx642. Linhagens altamente contrastantes para a tolerância ao Al, como

SC283 (tolerante) e BR007 (sensível ao Al), apresentaram haplótipos idênticos para a região codante do gene *SbMATE*. Polimorfismos foram encontrados particularmente em regiões intrônicas. Portanto, esses resultados indicam que os polimorfismos causadores dos efeitos alélicos não alteram a sequência da proteína, tendo natureza regulatória quanto à expressão do gene *SbMATE*.

Significância dos resultados para o melhoramento molecular da tolerância ao alumínio em sorgo

O gene *SbMATE*, que confere tolerância ao Al via o loco *Alt_{SB}*, foi isolado com base no seu efeito

acentuado em *cis*. Portanto, na população de mapeamento utilizada, grande parte da variação fenotípica foi capturada pelo loco *Alt_{SB}*, permitindo o mapeamento de alta resolução do loco de tolerância. Esses resultados indicaram que a tolerância ao Al em sorgo pode ser abordada do ponto de vista qualitativo, e que o melhoramento molecular poderia ser feito por meio de retrocruzamento assistido com base somente no loco *Alt_{SB}*.

Entretanto, o presente trabalho indica que, ainda que a regulação da expressão do gene *SbMATE* seja controlada extensivamente em *cis*, locos acessórios fora da região do loco *Alt_{SB}* produzem efeitos em *trans* significativos em algumas fontes de tolerância. Por exemplo, a

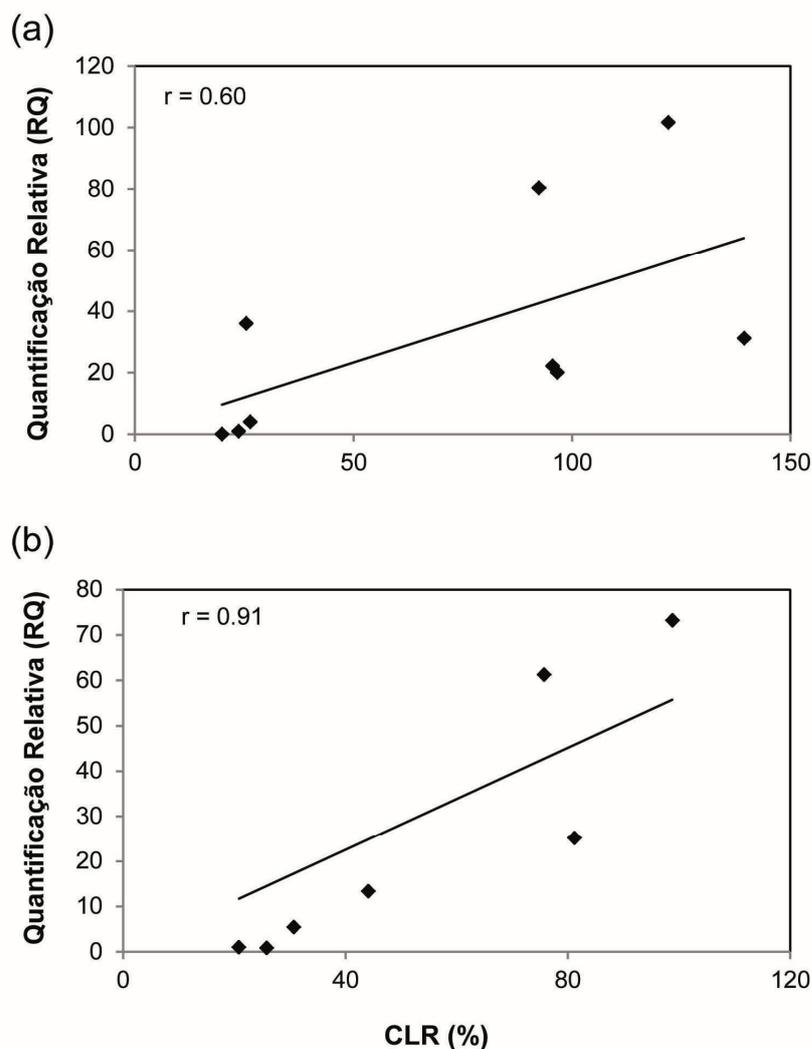


Figura 3. Análise de correlação entre a tolerância ao Al (CLR) e a expressão relativa do gene *SbMATE* em linhagens (a) e linhagens semi-isogênicas (b).

linhagem 3DX apresenta tolerância ao Al e alta expressão do gene *SbMATE*. Entretanto, a ISO derivada de 3DX apresenta baixa expressão do gene *SbMATE* e consequente alta sensibilidade ao Al tóxico. Portanto, se somente o loco *Alt_{SB}* da fonte 3DX for utilizado para introgressão assistida do loco *Alt_{SB}* em linhagens recorrentes sensíveis, espera-se uma transferência parcial da tolerância da linhagem doadora e consequente sensibilidade ao Al da linhagem de introgressão, frustrando as expectativas de melhoramento molecular com essa fonte de tolerância.

quando introgridido em diferentes contextos genéticos. Estamos dedicando esforços para o entendimento dos efeitos regulatórios que afetam a expressão do gene *SbMATE*, bem como para isolamento dos locos acessórios, para que seja possível evitar efeitos de *background* genético no melhoramento molecular para a tolerância ao Al com base no loco *Alt_{SB}* em sorgo.

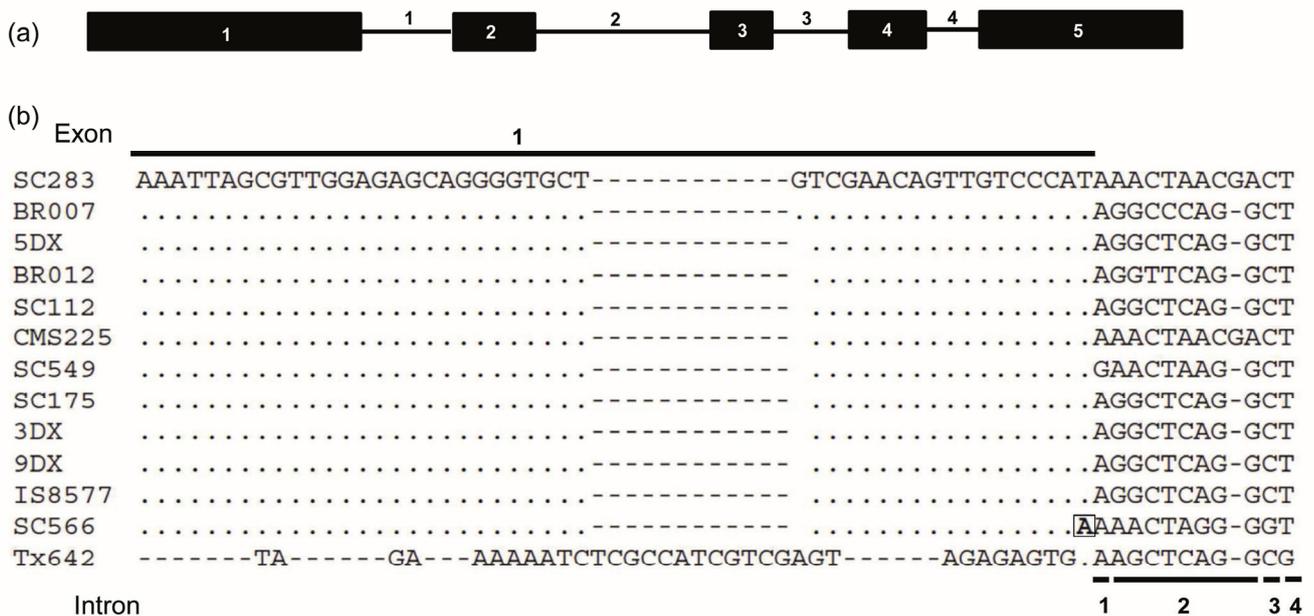


Figura 4. Estrutura genômica do gene *SbMATE* em diferentes linhagens de sorgo (a). Exons são representados por retângulos enquanto as linhas indicam os introns. Alinhamento parcial do gene *SbMATE* indicando os polimorfismos (b).

Os dados desse trabalho também indicam que fontes altamente tolerantes ao Al, como as linhagens SC283 e SC566, apresentam controle da expressão predominantemente em *cis*. Portanto, ao se utilizar o loco *Alt_{SB}* dessas duas fontes para a introgressão assistida, as linhagens de introgressão resultantes, ainda que um pouco mais sensíveis do que as linhagens originais, reterão uma grande proporção da tolerância ao Al da linhagem doadora. Em geral, na ausência de informações mais detalhadas acerca dos locos responsáveis por efeitos em *trans*, fontes de tolerância ao Al como SC283 e SC566 devem ser preferenciais em programas de melhoramento molecular para a característica em questão. Novas fontes de tolerância devem ser definidas, não somente com base no fenótipo de tolerância ao Al e expressão do gene *SbMATE*, mas também considerando-se a retenção da tolerância conferida pelo gene *SbMATE*

Referências

CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; HAMBLIN, M.; BILLOT, C.; RAMI, J.-F.; HUFNAGEL, B.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J.; GARCIA, A. A. F.; HASH, C. T.; RAMU, P.; MITCHELL, S.; KRESIVICH, S.; OLIVEIRA, A. C. de; AVELLAR, G. de; BOREM, A.; GLASZMANN, J.-C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHAES, J. V. The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 6, June 2011.

CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BOREM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHAES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 5, p. 836-876, 2007.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The

roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2255-2262, 2007.

FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, F. J. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 48, p. 1081-1091, 2007.

HOEKENGA, O. A.; MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; CANÇADO, G. M. A.; SHAFF, J.; KOBAYASHI, Y.; RYAN, P. R.; DONG, B.; DELHAIZE, E.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y.; KOYAMA, H.; KOCHIAN, L. V. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 9738-9743, 2006.

JOHNSON, J. P.; CARVER, B. F.; BALIGAR, V. C. Expression of aluminum tolerance transferred from Atlas 66 to Hard winter wheat. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 103-108, 1997.

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.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p. 273-278, 2001.

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

MAGALHÃES, J. V. Aluminum tolerance genes are conserved between monocots and dicots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 9749-9750, 2006.

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MELO, J. O.; LANA, U. G. de P.; PIÑEROS, M. A.; ALVES, V. M. C.; GUIMARAES, C. T.; LIU, J.; ZHENG, Y.; ZHONG, S.; FEI, Z.; MARON, L. G.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. de. Incomplete transfer of accessory loci influencing SbMATE expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 276-288, 2013.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 645-653, 2004.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

UEXKÜLL, H. R. von; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMET, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. The Netherlands: Kluwer Academic, 1995. p. 5-19.

Circular Técnica, 180

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2012): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.
Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio
Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana
e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros.*
Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro.*
Tratamento das ilustrações: *Tânia Mara A. Barbosa.*
Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*