

Identificação de combinações alélicas dos genes *SbMATE*, *SbWRKY1* e *SbZNF1* que maximizem a tolerância ao alumínio em sorgo¹

Ana Luiza Soares Pereira de Paula ², Beatriz de Almeida Barros ³ e Jurandir Vieira Magalhães ⁴

¹ Trabalho financiado pelo CNPq

² Estudante do Curso de Engenharia Química do Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM. Bolsista PIBIC do convênio FAPEMIG/CNPq/Embrapa

³ Analista da Embrapa Milho e Sorgo

⁴ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

Vigência da bolsa: 11/10/2018 à 28/02/2019

INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é originário da África e é considerado o quinto cereal mais importante do mundo, após o milho, o trigo, o arroz e a cevada. No entanto, metade das terras agricultáveis do mundo possuem solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$), nos quais a principal limitação à produção vegetal é a toxidez causada pelo alumínio (Al), que restringe o crescimento vegetal. Um importante mecanismo fisiológico da tolerância ao Al em plantas, que atua excluindo íons Al^{3+} de sítios tóxicos na célula vegetal, consiste na liberação de ácidos orgânicos pelo ápice radicular. Isso ocorre por meio de transportadores de ácidos orgânicos localizados na membrana plasmática de células da raiz, cuja atividade leva a formação, na rizosfera, de complexos estáveis e não tóxicos desses ácidos orgânicos com íons Al^{3+} (Kochian et al., 2015).

Em sorgo, o gene *SbMATE* codifica uma proteína transportadora da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*), que confere tolerância a Al por meio da liberação de citrato ativada por Al nos ápices radiculares (Magalhães et al., 2007). No entanto, a introgressão assistida por marcadores do loco *Alt_{SB}* (que contém o gene *SbMATE*) em uma linhagem sensível resultou em uma transferência incompleta da tolerância ao Al em comparação ao parental doador tolerante, que foi coincidente com uma redução nos níveis de expressão do gene *SbMATE*. Isso sugere a atuação de fatores

regulatórios que controlam a expressão do gene *SbMATE* (Melo et al., 2013).

Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) associados à tolerância ao alumínio e à expressão do gene *SbMATE* foram mapeados na região de ~51 a 54 Mpb do cromossomo 9 do sorgo. Uma análise qualitativa dessa região baseada em *yeast one hybrid* (Y2H) identificou dois fatores de transcrição capazes de ativar o promotor do gene *SbMATE*: um fator de transcrição da família WRKY (*SbWRKY1*) e um gene que codifica uma proteína que contém um domínio do tipo zinc finger-DHHC (*SbZNF1*) (Melo et al., 2019). A determinação do quanto cada fator de transcrição afeta a expressão do gene *SbMATE* pode ser estimada avaliando-se a expressão do gene *SbMATE* e a tolerância ao alumínio em linhagens recombinantes endogâmicas (*Recombinant Inbred Lines*, RILs) com diferentes combinações dos alelos parentais de *SbWRKY1* e *SbZNF1* (haplótipos).

Nesse trabalho, foram identificados indivíduos com diferentes combinações alélicas para os genes *SbMATE*, *SbWRKY1* e *SbZNF1* em uma população de RILs obtida a partir do cruzamento entre as linhagens de sorgo SC566 e BR007. A análise da expressão do gene *SbMATE* e da tolerância ao Al nas RILs com diferentes haplótipos desses genes poderá levar à identificação de combinações alélicas que maximizem a expressão do gene *SbMATE* em sorgo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Genético

Foram utilizadas as linhagens SC566 (tolerante ao alumínio) e BR007 (sensível), além de 315 linhagens endogâmicas recombinantes (RILs), na geração F7, obtidas a partir do cruzamento entre elas.

Desenvolvimento de marcadores e genotipagem

A extração de DNA foi realizada a partir de discos foliares de acordo com o descrito por Lana et al. (2010). O SNP 6083, descrito por Caniato et al. (2014), foi convertido para o ensaio KASP (*Kompetitive Allele Specific PCR*) e utilizado para a genotipagem do gene *SbMATE*.

Alelos dos genes *SbWRKY1* e *SbZNF1* foram sequenciados para a identificação de polimorfismos. Um indel (inserção/deleção) de 15 pb (+ CTCTTTACCGGGAGT em SC566) e outro de 13 pb (+ CAGCGGTCTTTAG em SC566) foram encontrados na região promotora de *SbWRKY1* e *SbZNF1*. Esses polimorfismos foram selecionados para o desenho de marcadores moleculares.

Genotipagem do gene *SbMATE*

Para identificação de indivíduos contendo os alelos tolerante e sensível do gene *SbMATE*, foi utilizado o ensaio KASP 6083_CA nas condições indicadas pela LGC Genomics (www.lgcgroup.com/services/genotyping/#.XGFRfVxKiUk). A intensidade da fluorescência das amostras foi quantificada no leitor de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech), utilizando a fluorescência ROX na normalização do sinal, e a genotipagem foi realizada utilizando o software KlusterCaller.

Genotipagem do gene *SbWRKY1*

Primers flanqueando o indel encontrado (F: 5'-GCCGACGGTCATATTTTGCC - 3'/ R: 5'-AAACCTTATTTGCCACACACC-3') foram desenhados para amplificar fragmentos de 423 pb em SC566 e 408 pb em BR007. Esses fragmentos foram obtidos utilizando 75 ng de DNA genômico, GoTaq Colorless Master Mix 1X (Promega) e 0,25 μ M de cada primer. As condições de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 55 °C por 20 segundos e 72 °C por 30 segundos, seguindo-se uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Logo em seguida, 3,0 μ L do produto de PCR foram digeridos com 1 U da enzima *AluI* (Anza 44 AluI, Invitrogen), Anza Buffer 1X a 37 °C por 2 horas. O padrão de digestão foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

*Genotipagem do gene *SbZNF1**

De maneira semelhante, primers foram desenhados (F: 5'-TGGCCATCTATAGGCGCGGG-3'/ R: 5'-GGCTCCCTACGCGTGTTTCAT-3') para amplificar fragmentos de 240 e 227 pb em SC566 e BR007, respectivamente. As reações de PCR continham 75 ng de DNA genômico, Colorless GoTaq® Flexi Buffer 1X, MgCl₂ 2,0 mM, dNTPs 250 μ M, 0,25 μ M de cada primer e 1 U de GoTaq® Flexi DNA

Polymerase (Promega). As condições de amplificação consistiram de desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 60 °C por 20 segundos e 72 °C por 20 segundos, seguindo-se uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. O padrão da amplificação foi resolvido por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

RESULTADOS

O sequenciamento da região promotora dos genes *SbWRKY1* e *SbZNF1* permitiu a identificação de polimorfismos (*indel*), que foram convertidos em marcadores moleculares e validados nas linhagens parentais (Figura 1). Para *SbWRKY1* foram amplificados fragmentos de 423 e 408 pb para SC566 e BR007, respectivamente. Após a digestão com a enzima *Alu I*, foi obtido um fragmento de 243 pb para ambos os genótipos e um segundo de 180 pb para SC566 e de 165 pb para BR007. Já para *SbZNF1*, foram obtidos os fragmentos de 240 e 227 pb para SC566 e BR007 conforme o esperado.

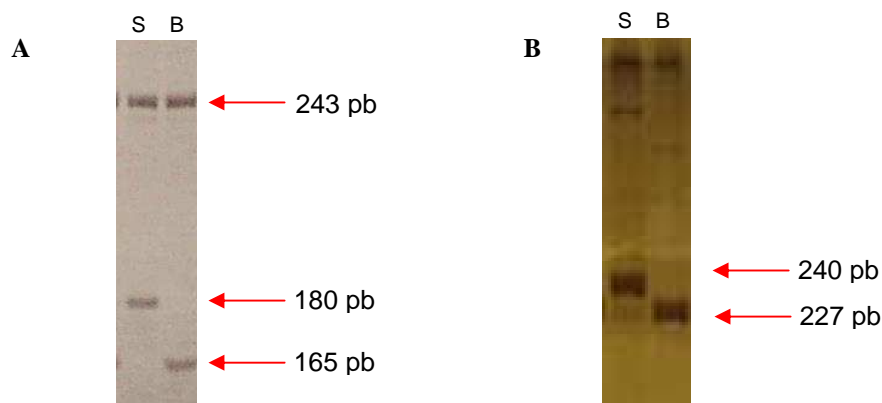


Figura 1: Polimorfismos validados para genotipagem dos genes *SbWRKY1* (A) e *SbZNF1* (B) nas linhagens SC566 e BR007 além de populações delas derivadas. S e B indicam as linhagens parentais, SC566 e BR007, respectivamente.

Após a validação dos novos marcadores, os 315 indivíduos da população de RILs foram genotipados para os três genes e a segregação alélica obtida para cada um isoladamente seguiu a proporção mendeliana de 1:1, conforme o esperado em uma população de RILs (dados não mostrados). Foram encontrados indivíduos representantes de todas as classes genotípicas esperadas (Tabela 1). Esses indivíduos serão agora

utilizados para a realização de experimentos de tolerância ao alumínio e de expressão gênica para a determinação do quanto cada fator de transcrição afeta a expressão do gene *SbMATE* e, consequentemente, a tolerância ao alumínio em sorgo.

Tabela 1. Combinações alélicas encontradas e o número de RILs correspondentes a cada

| Classe genotípica | Nº de indivíduos |
|--|------------------|
| M ⁺ W ⁺ Z ⁺ | 53 |
| M ⁺ W ⁺ z ⁻ | 15 |
| M ⁺ w ⁻ Z ⁺ | 25 |
| m ⁻ W ⁺ Z ⁺ | 45 |
| m ⁻ W ⁺ z ⁻ | 12 |
| m ⁻ w ⁻ Z ⁺ | 17 |
| m ⁻ w ⁻ z ⁻ | 44 |

M⁺, W⁺ e Z⁺ = alelos de SC566 para *SbMATE*, *SbWRKY1* e *SbZNF1*, respectivamente.

m⁻, w⁻ e z⁻ = alelos de BR007 para *SbMATE*, *SbWRKY1* e *SbZNF1*, respectivamente.

CONCLUSÃO

A identificação de diferentes combinações alélicas para os genes *SbMATE*, *SbWRKY1* e *SbZNF1*, e a avaliação futura dos efeitos dos fatores de transcrição na expressão do gene *SbMATE*, possibilitará a utilização de combinações alélicas favoráveis para maximizar a eficiência do gene *SbMATE* na tolerância ao Al, contribuindo para o aumento da produtividade do sorgo cultivado em solos ácidos.

REFERÊNCIAS

CANIATO, F. F.; HAMBLIN, M. T.; GUIMARÃES, C. T.; ZHANG, Z.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHÃES, J. V. Association mapping provides insights into the origin and the fine structure of the sorghum aluminum tolerance locus, *AltSB*. *Plos One*, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2014.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 66, p. 571-598, 2015.

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. de; OLIVEIRA, B. C. F. S. **Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104).

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARÃES, 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.; GUIMARÃES, C. T.; LIU, J.; ZHENG, Y.; ZHONG, S.; FEI, Z.; MARON, L. G.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHÃES, 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, Jan. 2013.

MELO, J. O.; MARTINS, L. G. C.; BARROS, B. de A.; PIMENTA, M. R.; LANA, U. G. de P.; DUARTE, C. E. M.; PASTINA, M. M.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; FONTES, E. P. B.; MAGALHÃES, J. V. de. Repeat variants for the SbMATE transporter protect sorghum roots from aluminum toxicity by transcriptional interplay in cis and trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 116, n. 1, p. 313-318, 2019.