EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE *ALMT1* DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM LINHAGENS DE TRIGO

Fabieli da Silva Ferraz (PIBIC/CNPq/UEPG), Caroline de Jesus Coelho (Co-orientadora - Bolsista PNPD-CAPES), Rodrigo Rodrigues Matiello (Orientador), e-mail: rrmatiel@uepg.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade

Ciências Agrárias / Fitotecnia

Palavras-chave: *Triticum aestivum L.*, Al tóxico, RT-qPCR, Genética Vegetal.

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a expressão diferencial do gene *ALMT1* associado à tolerância ao alumínio nas linhagens de trigo L 01 e L 14 (tolerante e sensível, respectivamente) pertencentes ao Programa de Melhoramento da UEPG, assim como verificar o período no qual ocorre a máxima expressão do gene após a exposição ao Al. As linhagens de trigo foram expostas à solução mínima contendo 4 mg L^{-1} de Al pelos períodos de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. Em seguida, foi realizada a extração do RNA total de cada linhagem, seguido da sua conversão em cDNA, a partir dos quais foram realizados os ensaios de RT-qPCR. Os resultados revelaram que a linhagem L 01 (tolerante) após curto período apresentou expressão do gene *ALMT1*, obtendo pico de expressão gênica com 6 h de exposição ao Al. Os resultados demonstraram que a expressão é regulada pela presença do alumínio, sendo que a partir de 1 hora de exposição ao Al foi possível observar aumento na expressão do gene de tolerância ao alumínio na linhagem L01.

Introdução

No Brasil, uma das principais limitações da produção do trigo está relacionada a ocorrência dos solos ácidos. Neste solo o pH fica abaixo de 5,5, ocorrendo a solubilização do alumínio trivalente (Al^{3+}) que é facilmente absorvido pelas raízes e tóxico as plantas (SILVA et al., 2018).

O trigo é uma das espécies mais sensíveis ao efeito tóxico do Al e o uso de genótipos tolerantes é uma alternativa para o cultivo em solos com alta saturação por Al (SILVA et al., 2018). Neste sentido, entender os mecanismos de tolerância ao Al para o desenvolvimento de genótipos tolerantes tem sido uma importante estratégia nos programas de melhoramento (HARTWIG et al., 2007).

No trigo, o malato é o ácido orgânico apontado como o principal mecanismo de tolerância ao Al. Sasaki et al. (2004) isolaram e caracterizaram o gene *ALMT1* (*Aluminum Malate Transporter 1*) em genótipos de trigo, responsável por codificar uma proteína de membrana expressa na presença do Al que facilita o efluxo de malato, que atua quelando o Al e desintoxicando as células, conferindo tolerância a planta (BOFF, 2006; ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

A técnica de PCR em tempo real tem sido promissora em pesquisas que relacionam genes de interesse em plantas expostas a estresses abióticos, podendo ser usada para avaliar a expressão de genes relacionados com a tolerância ao Al em trigo (QUEIROZ, 2010). Neste sentido, os objetivos desse trabalho foram quantificar a expressão diferencial do gene *ALMT1* em genótipos de trigo contrastantes para a tolerância ao Al e determinar o período após a exposição ao Al onde ocorre a expressão máxima do gene *ALMT1*.

Material e Métodos

Foram avaliadas as linhagens de trigo L 01 e L 14 (tolerante e sensível ao Al, respectivamente), pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de Planta da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Após a germinação das sementes em câmara de germinação, foram selecionadas 12 plântulas de cada linhagem e acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido, as quais foram depositadas sobre a solução tratamento composta de 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} + 4 mg L^{-1} de Al^{3+}, mantida com aeração constante e pH entre 4,2 a 4,5. As raízes das plântulas foram expostas a solução mínima com alumínio por períodos de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas.

Após o período de exposição de cada tratamento, as raízes foram fragmentadas com nitrogênio líquido e o RNA total foi extraído utilizando o kit RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Helthcare UK Limited), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a síntese dos cDNAs, aproximadamente 1,5 µg de RNA total foi submetido a transcrição reversa através do kit comercial GoScript™ Reverse Transcription Mix, seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

A quantificação do RNA total foi realizada no espectrofotômetro Eppendorf BioPhotometer D30. Para visualizar a integridade do RNA total foram alicotados 2,0 µL do RNA extraído acrescido de tampão de carregamento e corante GelRed na proporção de 1:1. As amostras foram aplicadas em gel de agarose a 1% a 50 V por 1:30h. A integridade do RNA foi visualizada através do equipamento AlphaImager HP System.

A análise da expressão gênica foi realizada por ensaios de qRT-PCR no equipamento AriaMx Real Time PCR System (Agilent®). Para a amplificação do transcrito do gene *ALMT1* foram utilizados os primers forward 5'-CGTGAAAGCAG CGGAAAGCC-3' e reverse 5'-CCCTCGACTCACGGTACTAACAACG-3' e como controle interno foi amplificado o gene da Tubulina através dos primers forward 5'-TGGGATGCCAAGAACATGATG-3' e reverse 5'-AACATGGCCGTGAACTGCTCGC-3' (SASAKI et al., 2004).

Para a amplificação foram utilizados: SYBR® Green Master Mix 1X, 10 µM dos primers, 2 µL de cDNA (10 ng μL^{-1}) de cada amostra e água para completar 20 µL de reação. A ciclagem consistiu de: 10 min a 95ºC e 40 ciclos de: 15 s a 95ºC, 30 s a 64ºC e 30 s a 72ºC. A curva de dissociação foi composta pela seguinte programação: 1 min a 94ºC, 30 s a 55ºC e 10 s a 94ºC. Os níveis de expressão diferencial de cada gene foram calculados através do método ddCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) através do programa GenEx Enterprise.

Resultados e Discussão

A quantificação da concentração do RNA total extraído, evidenciou amostras com quantidade adequadas e concentrações variando de 92,8 a 349,0 ng μL^{-1}. A relação de absorbância A 260/280 apresentou variação de 1,82 a 2,98, indicando baixa contaminação por proteínas e a relação A 260/230 variou de 1,26 a 4,03, indicando baixa contaminação por polissacarídeos e polifenóis nas amostras de RNA total extraídas.

Através da corrida eletroforética em gel de agarose 1% confirmou-se a integridade do RNA total extraído das 16 amostras (Figura 1).

O padrão de expressão do gene *ALMT1* foi verificado através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (Figura 2). O tempo de 0 horas de exposição ao Al foi utilizado como controle experimental, sendo confirmada que a expressão do gene

ALMT1 é regulada pela presença do alumínio, havendo aumento da expressão a partir de 1 hora de exposição ao Al. De 1 a 6 horas observou-se maior expressão do gene na linhagem tolerante L 01, atingindo pico de expressão no período de 6 horas de exposição. A partir de 24 horas de exposição, houve um incremento de expressão na linhagem sensível L 14. Com 48 h de exposição, ocorreu uma inversão na expressão do gene *ALMT1* das linhagens de trigo, sendo que a L 14 (sensível) apresentou um pico de expressão do gene ALMT1 em relação a linhagem L 01 (tolerante) (Figura 2).

Resultados semelhantes foram relatados por Gou et al. (2007), em duas linhagens de trigo contrastantes para a tolerância ao Al. Os autores identificaram a expressão de vários genes nos genótipos submetidos ao Al por diferentes períodos de tempo, sendo que o gene *ALMT1* apresentou a maior expressão em relação aos demais. Os autores observaram que o nível de expressão do gene *ALMT1* foi maior na linhagem tolerante e aumentou significativamente entre 3 e 6 horas de exposição ao Al, mas sugerem que os resultados poderiam indicar que a tolerância ao Al seria co-regulada por múltiplos genes com diversas funções.

Figura 1. Visualização do perfil eletroforético do RNA total extraído das linhagens L 01 (tolerante) e L 14 (sensível) ao alumínio nos diferentes tempos de exposição ao Al (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48h) antes do tratamento com a enzima DNAse, em gel de agarose 1%. “M” marcador de 100 pb. Ponta Grossa, 2019.

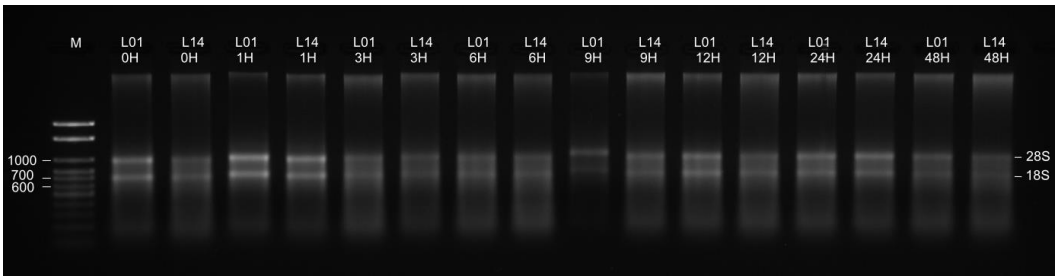
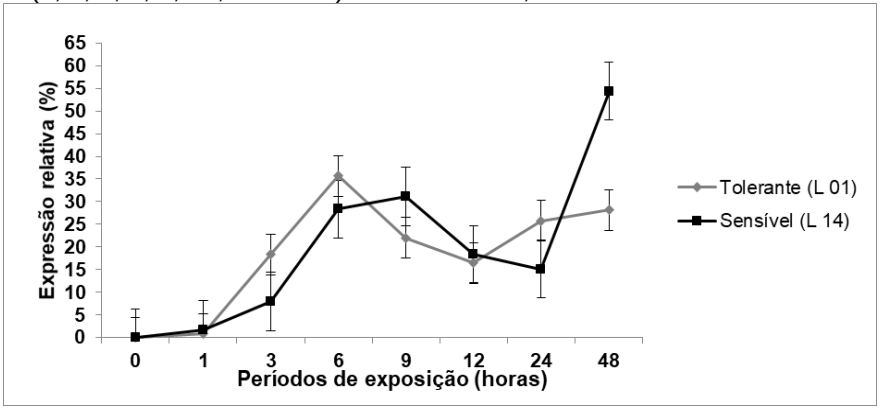


Figura 2. Expressão relativa do gene *ALMT1* nas linhagens L01 e L14, em função do período de exposição ao Al (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48h). Ponta Grossa, 2019.



É possível observar que a linhagem tolerante L 01 após um curto período de exposição ao Al, cerca de 1 hora, apresentou maior expressão do gene *ALMT1* em relação a linhagem sensível, sugerindo maior eficiência na velocidade de início da expressão do gene quando em contato com o fator estressante. Entretanto, após 48 horas de exposição a linhagem sensível L 14 apresentou um pico de expressão do gene *ALMT1*, mas apesar disso o período em contato com o Al com baixa expressão do gene pode ser suficiente para causar danos nas raízes das plântulas. Resultados semelhantes foram relatados por Sasaki et al. (2006) ao estudarem o gene *ALMT1* e sua relação com a tolerância ao alumínio em 34 linhagens de trigo. Neste trabalho

os autores demonstraram que sete linhagens apresentaram baixa correlação entre a expressão do gene *ALMT1* e a tolerância ao alumínio

Ao medir o efluxo de malato ativado pela presença do Al e comparar com a expressão do gene (SASAKI et al., 2006), verificaram que o efluxo do malato foi altamente correlacionado com a tolerância ao Al, mas pouco correlacionado com a expressão de *ALMT1.* Segundo os autores, esses resultados sugerem que há algum fator além do nível de expressão do gene *ALMT1* envolvido no controle de efluxo de malato, porque linhagens relativamente sensíveis ao Al apresentaram níveis elevados de expressão do gene de tolerância ao Al.

Os resultados encontrados nesta pesquisa sugerem a possibilidade de haver outros genes envolvidos na tolerância ao Al em trigo, como, por exemplo, o gene *TaMATE* (*Triticum aestivum Multi-drug and Toxic Extrusion)*, o qual é responsável pela ativação de transportadores da membrana que mediam o efluxo de citrato no ápice das raízes. Dessa forma, verifica-se que é de extrema importância aprofundar a pesquisa cientifica a respeito da tolerância ao Al nestas linhagens de trigo do programa de melhoramento genético da UEPG envolvendo a expressão de outros genes de tolerância ao alumínio.

Conclusões

A linhagem L 01 (tolerante) apresentou expressão do gene *ALMT1* em um curto período de exposição em relação a linhagem L 14 (sensível).

O pico de expressão do gene ALMT1 na linhagem L 01 ocorreu após 6 horas de exposição ao Al.

Agradecimentos

A UEPG e ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Cientifica PIBIC/CNPq. A Drª. Caroline de Jesus Coelho e ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello por todas as orientações e auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

Referências

BOFF, T. **Tolerância ao alumínio em trigo: identificação e caracterização molecular**. Porto Alegre: UFRGS. 186p. Tese de Doutorado. 2006.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.531-541, 2001.

GOU, P. G. et al. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v.277, p.1–12, 2007.

HARTWIG, I. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.2, p.219-228, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular a dois genótipos de milho à limitação hídrica**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista. 154p. Tese de Doutorado. 2010.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding aluminium-activated malate transporter. **Plant Journal**, v.37, p.645-653, 2004.

SASAKI, T. et al. Sequence Upstream of the Wheat (Triticum aestivum *L.*) *ALMT1* Gene and its Relationship to Aluminum Resistance. **Plant and Cell Physiology**, v.47, n.10, p.1343-1353, 2006.

SILVA, G. B. P. et al. Organic acid carriers in tolerance to toxic aluminum in wheat. **Soil Science**, v.48, n.10, p.1-9, 2018.