

## Transformação Genética de Sorgo com Gene de Tolerância ao Alumínio *ALMT1* Isolado de Trigo

<sup>1</sup>Andréa A. Carneiro, <sup>2</sup>Rosângela L. Brandão; <sup>2</sup>Gracielle T.P.C. Coelho; <sup>1</sup>Robert E. Schaffert;  
<sup>1</sup>Jurandir V. Magalhães; <sup>3</sup>Leandro R. Silva e <sup>1</sup>Newton P. Carneiro

<sup>1</sup> Núcleo de Biologia Aplicada - Embrapa Milho e Sorgo, CP. 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas-MG - [andreac@cnpms.embrapa.br](mailto:andreac@cnpms.embrapa.br), [rosangelaluci@gmail.com](mailto:rosangelaluci@gmail.com), [schaffer@cnpms.embrapa.br](mailto:schaffer@cnpms.embrapa.br), [jurandir@cnpms.embrapa.br](mailto:jurandir@cnpms.embrapa.br), [newtonc@cnpms.embrapa.br](mailto:newtonc@cnpms.embrapa.br); <sup>2</sup>Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Departamento de Fisiologia Vegetal, Lavras – MG - [gracielle.costa@gmail.com](mailto:gracielle.costa@gmail.com); <sup>3</sup> Faculdade São Camilo, Belo Horizonte-MG - [leobiotec@gmail.com](mailto:leobiotec@gmail.com).

Palavras-chave: Biobalística, Estresse abiótico, Transportador de Malato, Sorghum.

O alumínio, além de abundante, apresenta alta disponibilidade, sendo facilmente absorvido pelas plantas em solos ácidos de todo o mundo. Este elemento tem efeitos tóxicos responsáveis por anormalidades no crescimento de espécies importantes para a agricultura (Matsumoto et al., 1976). Em decorrência de vários processos de acidificação, formas fitotóxicas de  $Al^{+3}$  são liberadas para a solução do solo em níveis que afetam o crescimento das plantas (Kochian, 1995). Secreção de ácidos orgânicos e fosfato pelos ápices das raízes e alcalinização da rizosfera são alguns dos mecanismos mais importantes de tolerância ao Al (Wenzl et al., 2001). Os ácidos orgânicos na rizosfera, como citrato, malato e oxalato podem proteger as plantas do estresse provocado pelo alumínio, por se ligarem com o cátion tóxico  $Al^{+3}$  e formarem complexos inofensivos. Acredita-se também que algumas espécies liberem citrato quando há deficiência de P no solo (Ryan et al., 2003).

Diversas plantas, incluindo o milho e o trigo, liberam ácidos orgânicos pelas raízes, os quais estão envolvidos na tolerância ao Al e no mecanismo pelo qual as plantas adquirem P do solo (Kochian, 1995). O citrato, por exemplo, exudado pelas raízes, pode liberar fosfato de formas não disponíveis para formas mais facilmente assimiláveis para plantas (Hue et al., 1986).

Em trigo tem sido muito estudado o mecanismo para tolerância ao alumínio (Delhaize et al., 2004). Ryan et al. (1997) e Zhang et al. (2001) identificaram na membrana plasmática de células do ápice da raiz, um canal de anion, permeável para o malato, ativado por Al. Sasaki et al. (2004), usando linhagens de trigo quase-isogênicas que diferem na tolerância ao alumínio, clonaram o gene de trigo transportador de malato ativado pelo Al, identificado como *ALMT1*. Este gene foi utilizado por Delhaize et al. (2004) para transformar plantas de cevada sensíveis ao alumínio. Estes autores demonstraram que as plantas transgênicas superexpressando *ALMT1* são mais tolerantes ao Al do que plantas selvagens.

A estratégia do melhoramento de plantas em desenvolver genótipos que tolerem a presença do Al no solo vem tendo elevada importância. A recente disponibilidade de genes envolvidos na síntese de ácidos orgânicos e na aquisição de fosfato proporciona nova oportunidade para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao Al e mais eficientes para a aquisição de P. Desse modo, este trabalho foi realizado com o objetivo de superexpressar em

plantas da linhagem CMSXS 102B de sorgo, sensível ao alumínio, o gene *ALMT1*, e verificar sua tolerância ao alumínio.

Plantas transgênicas de sorgo foram obtidas via biobalística (Brandão et al.2005). Resumidamente, calos embriogênicos de sorgo provenientes de inflorescências imaturas, foram utilizados como explante para o bombardeamento de partículas cobertas com a construção gênica Ubiquitin::*ALMT1*::NOS. Durante o bombardeamento foram utilizadas micropartículas de tungstênio aceleradas através de um aparelho movido à hélio. DNA na concentração de 5 µg/µl foi precipitado sobre as micropartículas de tungstênio. Em seguida, estas foram cuidadosamente lavadas e ressuspendidas em 60 µl de etanol 100%. Sete microlitros foram depositados no centro dos macrocarreadores, discos (24 mm) de membranas Kapton (Du Pont). Estas membranas foram usadas no bombardeamento dos tecidos de interesse, utilizando 1200 psi de pressão de gás hélio e os explantes foram posicionadas a 6 cm da plataforma de lançamento das micropartículas. Foram mantidos constante a distância entre a câmara de gás de alta pressão e a membrana macrocarreadora (8 mm), distância entre a membrana macrocarreadora e a tela de retenção (12 mm) e a pressão de vácuo (27 mm Hg). Calos embriogênicos de sorgo foram subcultivados em meio contendo 12% de sacarose durante 4 horas ou 24 horas, antes do bombardeamento. O número de células expressando a antocianina foi verificado utilizando um estereoscópio Zeiss Stemi SV11. A seleção de plantas transgênicas foi iniciada 15 dias após bombardeamento quando os calos de sorgo foram transferidos para meio de multiplicação SIM (MS sais, 30 g.L<sup>-1</sup> sacarose, 100 mg.L<sup>-1</sup> myo-inositol, 1 mg.L<sup>-1</sup> tiamina, 7,5mg.L<sup>-1</sup> glicina, 0,2 mg.L<sup>-1</sup> cinetina e 2,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D e 2,5 g/L phytigel), suplementado com dosagens crescentes de glufosinato de amônia (3 e 9 mg/l). Calos que desenvolveram em meio seletivo foram transferidos para o meio de maturação RM (MS sais e vitaminas, 60 g/L sacarose, 100 mg/L myo-inositol, 0,2 mg/L ANA, 3 g/L phytigel, pH 5.8), acrescido de 6 mg/L glufosinato de amônia. Para regeneração, calos embriogênicos foram transferidos para meio MS, suplementado com 3 mg/L glufosinato de amônia e cultivados à 26°C em luz (16 horas). Plantas com aproximadamente 5 cm de altura foram transferidas para solo em casa de vegetação, onde completaram seu ciclo reprodutivo. Dez plantas foram capazes de crescer em meio seletivo contendo PPT, análises por PCR do DNA isolado destas plantas confirmou a presença do gene *bar* em nove e do gene *ALMT1* em quatro eventos. Análises preliminares de crescimento de plantas de sorgo em solução hidropônica contendo Al<sup>+3</sup> (Magnavaca et al., 1987) mostraram que os ápices das raízes das plantas de sorgo transgênicas foram menos afetados pelo alumínio do que os ápices das plantas isogênicas não transgênicas (Figura 1).

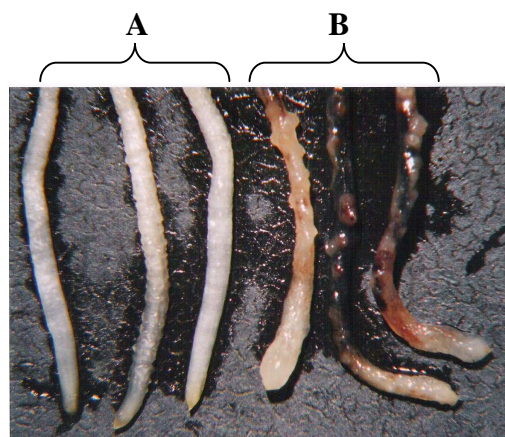


Figura 1: Raízes de sorgo crescido em solução hidropônica contendo  $Al^{+3}$ . (A) Sorgo transgênico expressando o gene *ALMT1*; (B) Sorgo isogênico não transgênico.

### Referências Bibliográficas

1. BRANDÃO R.L.; CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P. SCHAFFERT, R.E.; PAIVA, L.; COELHO, G.T.C.P. Transformação genética de sorgo utilizando o bombardeamento de partículas. **Série documentos Embrapa Milho e Sorgo**. Doc43.38pp.
2. DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. **Proc. Natl. Academic Science**, v.101, p.15249-15254, 2004.
3. HUE, N.V.; CRADDOCK, G.R.; ADAMS, F. Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.5, p.28-34, 1986
4. KOCHIAN, L.V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.46, p.237-260, 1995.
5. 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.
6. MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant Cellular Physiology**, Kioto, v.17, n.3, p.627-631, 1976.
7. RYAN, P.R.; DONG, B.; WATT, M.; KATAOKA, T.; DELHAIZE, E. Strategies to isolate transporters that facilitate organic anion efflux from plant roots. **Plant Soil**, v.248, p.61-69, 2003.
8. RYAN, P.R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S.D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proc. Nat. Acad. Science**, v.94, p.6547-6552, 1997.
9. 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. **Plant Journal**, v.37, p.645-653, 2004.
10. WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, n.3, p.1473-1484, 2001.

11. ZHANG, W.H.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, v.125, p.1459–1472, 2001.