

Obtenção de linhagens isogênicas para QTLs de tolerância ao alumínio em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores

Carlos F. S. Tinoco¹, Jurandir V. Magalhães², Ubiraci G. P. Lana³, Sílvia N. J. Belicuas², Sidney N. Parentoni², Lauro J. M. Guimarães² e Claudia T. Guimarães²

¹ Bolsista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151, carlosfasane@yahoo.com.br, ² Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151, ³ Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151

Palavras-chave: *Zea mays* L., tolerância ao Al, retrocruzamento assistido, marcadores SSR.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social, sendo cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo para a alimentação humana, animal e, mais recentemente, como fonte de biocombustível. Nos últimos anos, a produção desta cultura no Brasil vem experimentando aumentos expressivos, tendo esse setor um impacto significativo na sustentabilidade nacional. Atualmente, o país é o terceiro maior produtor de milho do mundo, sendo superado pelos Estados Unidos e pela China (GARCIA et al., 2006).

Entretanto, a produtividade média brasileira, ainda é considerada baixa se comparada à de outros países produtores. Dentre os fatores que contribuem para a baixa produtividade, destaca-se a toxidez causada pelo alumínio (Al), intrínseca aos solos ácidos predominantes nas regiões agrícolas tropicais (FAO, 2007). Estes solos compreendem aproximadamente 48% da área agricultável em todo mundo (UEXKULL; MUTERT, 1995).

Uma vez sob condições de baixo pH, o Al assume a forma do íon Al^{3+} , passando a ser solúvel e extremamente tóxico às plantas (KOCHIAN; JONES, 1997). A toxidez de Al provoca uma rápida inibição do crescimento radicular, acarretando maior susceptibilidade das plantas à seca e a deficiências minerais, resultando em baixa produtividade agrícola (KOCHIAN, 1995).

Genótipos tolerantes ao Al têm sido identificados em diferentes espécies vegetais, porém, os mecanismos fisiológicos e dos fatores genéticos responsáveis pela tolerância ao alumínio precisam ser melhor compreendidos. A tolerância ao Al em milho apresenta herança quantitativa sob controle de um número reduzido de genes (MAGNAVACA et al., 1987; LIMA et al., 1995). Concordando com tais resultados, Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco QTLs de tolerância ao Al, sendo que apenas aquele localizado no bin 6.00 foi coincidente com os estudos de Sibov et al. (1999). Recentemente, Maron et al. (2010) identificaram dois genes candidatos, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, que colocalizaram com dois QTLs de maior efeito na população de RILs derivada do cruzamento entre Cateto Al237 e L53 (Guimarães et al., dados não publicados).

Tais genes candidatos requerem estudos mais avançados, necessitando de estoques genéticos apropriados como linhagens isogênicas. As linhagens isogênicas apresentam vantagens nos estudos genético-moleculares e fisiológicos, uma vez que apresentam background genético homogêneo, variando apenas na região de interesse. No entanto, o tempo gasto para o seu desenvolvimento é a principal limitação para a ampla utilização desses genótipos. O método do retrocruzamento é o mais utilizado quando se tem por objetivo a



introgessão de uma característica, com a subsequente recuperação do genoma recorrente, sendo geralmente utilizado para corrigir genótipos-elites em características governadas por um ou poucos genes.

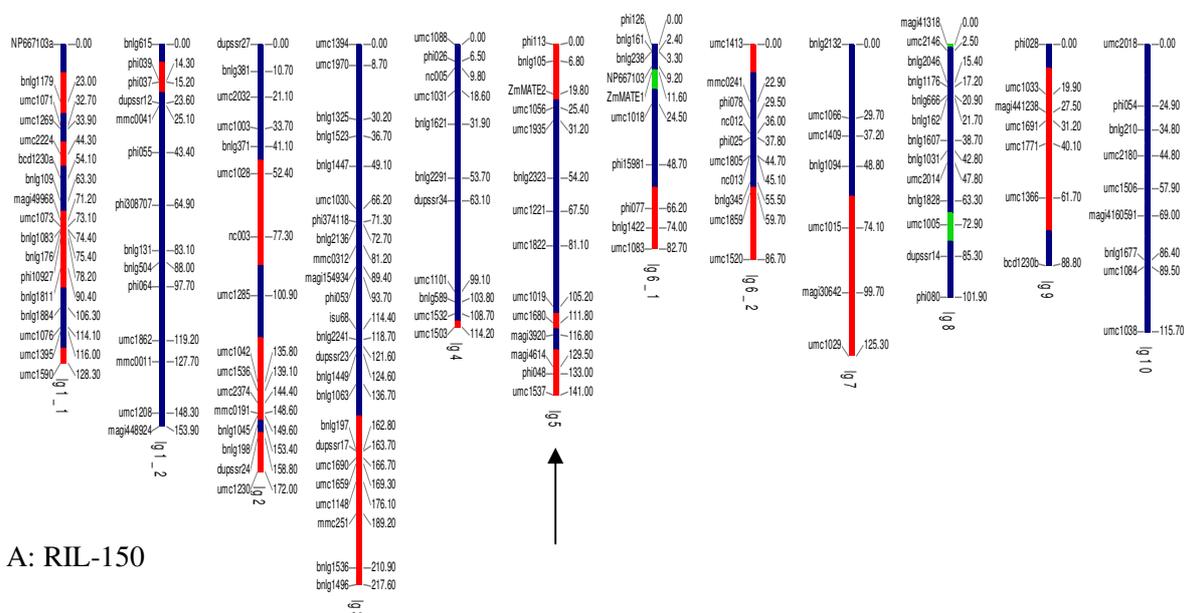
O advento dos marcadores moleculares possibilitou a sua utilização para acelerar os programas de melhoramento, com base na seleção assistida. Considerando um programa de retrocruzamento assistido, a seleção pode ser para acompanhar a introgessão dos alelos favoráveis e para acelerar a recuperação do genoma recorrente (RIBAUT et al., 2002; DREHER et al., 2003), tendo sido utilizado também para geração de linhagens semi-isogênicas ou NILs (*Near Isogenic Lines*) (STUBER et al., 1999).

Assim, o objetivo deste trabalho foi utilizar a estratégia de retrocruzamento assistido no desenvolvimento de linhagens semi-isogênicas para dois QTLs de efeito maior associados com a tolerância ao Al em milho, onde foram previamente colocados dois genes candidatos *ZmMATE1* e *ZmMATE2*.

Material e Métodos

Seleção das Linhagens Doadoras

Em um estudo anterior, o mapeamento de QTL foi realizado em uma população de 118 RILs derivadas do cruzamento entre duas linhagens contrastantes Cateto Al237 e L53, tolerante e sensível ao alumínio, respectivamente. A população foi avaliada em solução nutritiva contendo 39 µM de alumínio e o mapa foi construído com 154 marcadores SSR, RFLP e STS. Dois QTLs de efeito maior foram identificados nos cromossomos 5 e 6 (indicados pelas setas na Figura 1), explicando em torno de 16% da variância fenotípica. Dentre as linhagens recombinantes, foram selecionadas duas delas, a RIL-150 e a RIL-84, apresentando apenas um dos QTLs de interesse cada, além de possuírem mais de 50% do genoma da L53 (Figura 1).



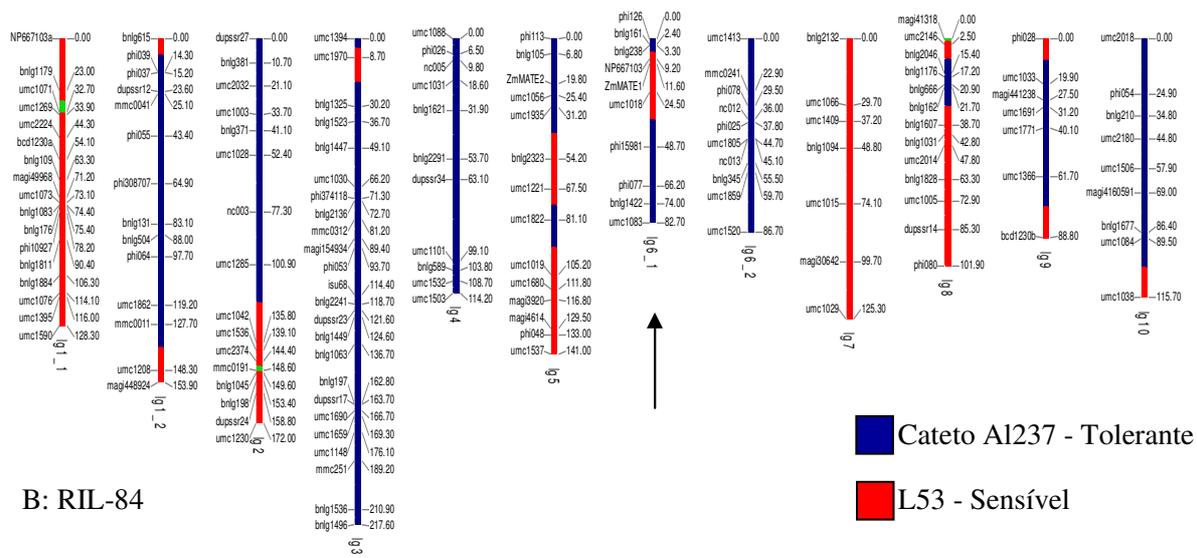


Figura 1: Genótipo gráfico das linhagens recombinantes RIL-150 e RIL-84 contendo os QTLs dos cromossomos 5 e 6, respectivamente.

Retrocruzamento Assistido

Cada uma das RILs foi cruzada com a linhagem L53, que foi utilizada como parental recorrente. A região de cada QTL de tolerância ao alumínio compreende um gene candidato, mapeado com marcadores derivados de sequências genômicas e um par de marcadores SSR flangeadores.

Progênie de cada RC_1 foram genotipadas, sendo selecionados os indivíduos heterozigotos para os genes candidatos e homozigotos para o genitor recorrente considerando os marcadores SSRs flangeando os QTLs. As plantas selecionadas para os QTLs foram retrocruzadas com a linhagem L53 e os indivíduos RC_2 foram novamente genotipados para os genes alvos e para marcadores distribuídos ao longo do genoma, a fim de aumentar a recuperação do genoma recorrente. Indivíduos com a maior recuperação do genoma recorrente foram autofecundados para a obtenção dos alelos dos genes candidatos em homozigose.

Adicionalmente, indivíduos RC_1 apresentando os locos de interesse foram cruzados entre si para a piramidação deles, utilizando os mesmos critérios de seleção genotípica.

Genotipagem com Marcadores Moleculares

A genotipagem foi realizada utilizando DNA genômico isolado de folhas jovens das plantas oriundas dos respectivos retrocruzamentos, seguindo o protocolo descrito por Saghai-Marooif et al. (1984), com algumas modificações.

As reações de amplificação utilizando iniciadores não marcados foram realizadas segundo descrito por Ninamango-Cárdenas et al. (2003). Os produtos de amplificação foram separados em géis de agarose 1,5% (m/v) corados com brometo de etídeo (Figura 2A) ou de poliacrilamida 10% (m/v) corado com $AgNO_3$ (Figura 2B). Já os produtos de amplificação utilizando iniciadores fluorescentes, marcados com as fluorescências NED, FAM ou HEX, foram gerados e analisados de acordo com Padilha (2002) no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems®) (Figura 2C).



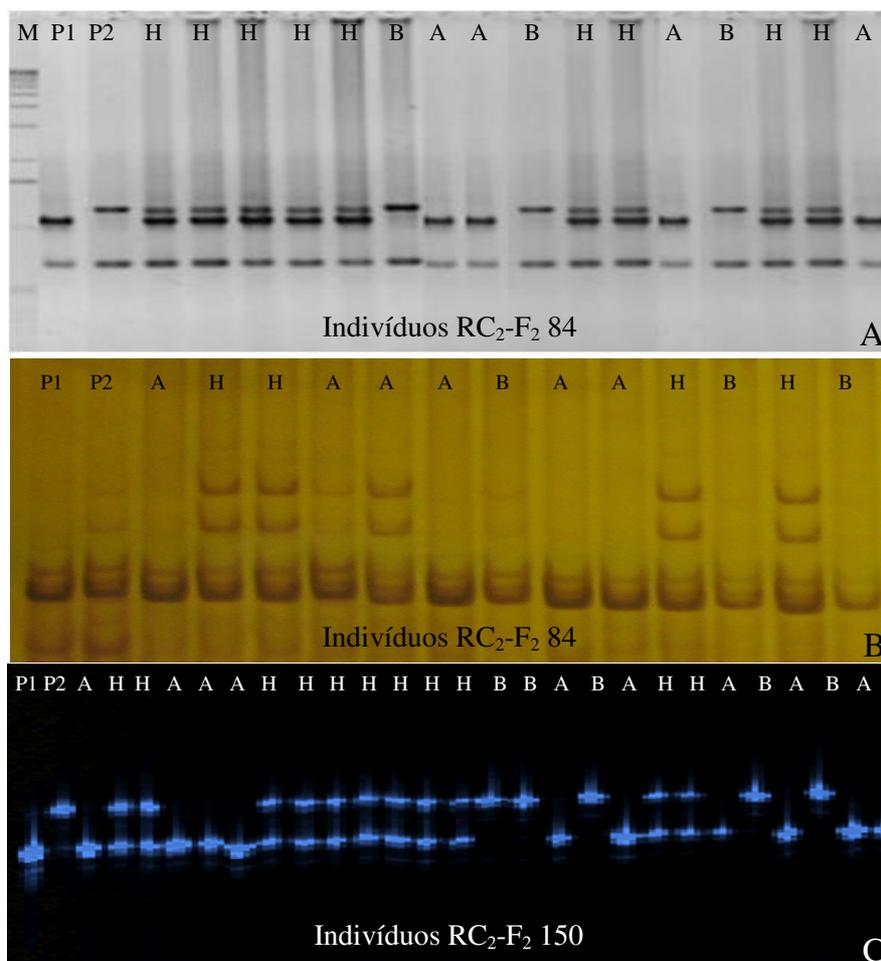


Figura 2. A - Padrão de amplificação do gene candidato *ZmMATE1* analisado em gel de agarose 1,5% (m/v). B - Padrão de amplificação do marcador SSR umc1018 visualizado em gel de poliacrilamida 10% (m/v). C - Padrão de amplificação do gene candidato *ZmMATE2* marcado com a fluorescência 6-FAM e avaliado no sequenciador automático ABI Prism 377. P1 - Linhagem doadora (Cateto A1237), P2 - Linhagem recorrente (L53), A - Alelo derivado da linhagem doadora, B - Alelo da linhagem recorrente e H – Heterozigoto.

Para a análise dos indivíduos da geração RC₂ foram avaliados 19 *primers*, previamente identificados como polimórficos entre as RILs e a L53. Os *primers* em heterozigose nos indivíduos RC₂ foram reavaliados nas suas progênes RC₃. Os dados moleculares foram codificados como A (alelo do genitor doador) e H (heterozigoto).

Resultados e Discussão

No primeiro ciclo de retrocruzamento foi realizada a seleção assistida por marcadores apenas para a região dos dois QTLs de efeito maior. Para a RIL-150 foram selecionados o gene candidato *ZmMATE2* e os marcadores SSR phi113 e bnlg105, localizados no cromossomo 5 (Figura 3A) e para a RIL-84 foram selecionados o gene candidato *ZmMATE1* e o marcador umc1018, localizados no cromossomo 6 (Figura 3B).



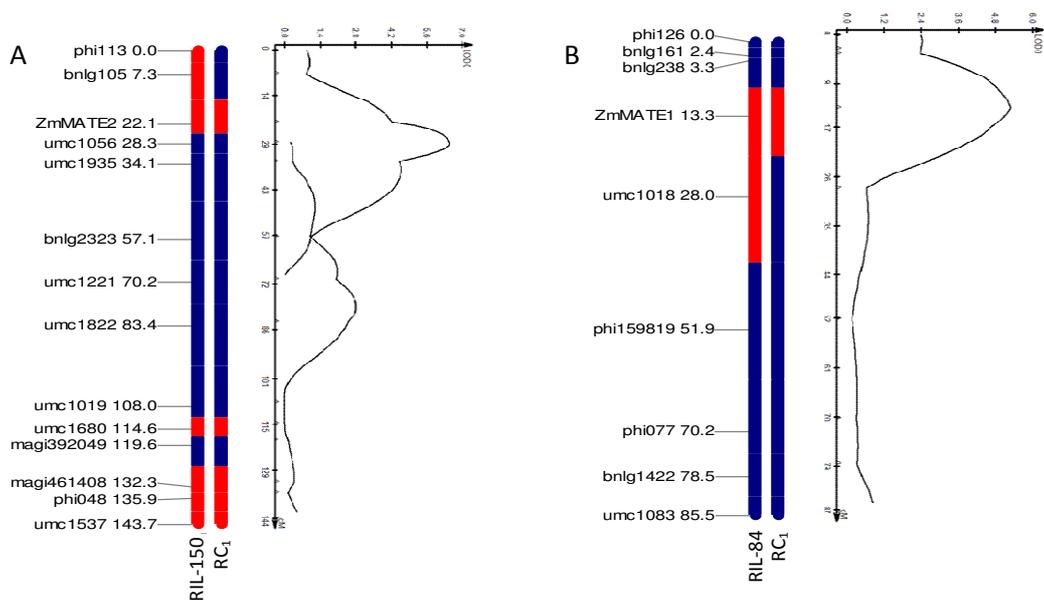


Figura 3. Região dos QTLs de efeito maior nos cromossomos 5 (A) e 6 (B) antes e após um ciclo de retrocruzamento assistido por marcadores indicando a conversão das regiões genômicas flanqueando os respectivos genes candidatos *ZmMATE2* e *ZmMATE1*.

No segundo ciclo de retrocruzamento, dos 19 *primers* SSR avaliados, foram selecionados os indivíduos que possuíam pelo menos 17 deles em homozigose, indicando uma recuperação em torno de 89% do genoma recorrente. Considerando que cada uma das RILs originalmente apresentava em torno de 50% do genoma recorrente, os indivíduos do RC₂-F₂ obtidos após a seleção assistida podem ser considerados como possuindo pelo menos 96,9% do genoma recorrente, que equivale ao quarto ciclo de retrocruzamento. O uso da SAM acelerou a obtenção das linhagens isogênicas para dois QTLs de efeito maior associados com a tolerância ao AI em milho, que serão fundamentais para a validação dos efeitos dos QTLs e para estudos moleculares avançados.

Agradecimentos

O projeto contou com recursos da Fundação McKnight - CCRP, Generation Challenge Programme, FAPEMIG e Embrapa Milho e Sorgo.

Referências

DREHER, K.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J. M.; MORRIS, M. Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, p. 221-234, 2003.

FAO. **Statistical Database**. Rome, 2007. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>>. Acesso em: 15 maio 2010.



GARCIA, J. C.; MATTOSO, J. M.; DUARTE, J. O.; CRUZ, J. C. **Aspectos econômicos da produção e utilização do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 74).

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

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.

KOCHIAN, L. V.; JONES, D. L. Aluminum toxicity and resistance in plants. In: YOKEL, R. A.; GOLUB, M. S. (Ed.). **Research issues in Al toxicity**. Washington: Taylor e Francis, 1997. p. 69-89.

LIMA, M.; MIRANDA FILHO, J. B.; FURLANI, P. R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 4, p. 579-584, 1995.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; BC LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht : Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.

MARON, L. G.; PINEROS, M.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; PLEIMAN, J.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major Al tolerance QTL in maize. **Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 728-740, 2010.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 223-232, 2003.

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados para a caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 86 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

RIBAUT, J. M.; JIANG, C.; HOISINGTON, D. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 557-565, 2002.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.



SIBOV, S. T.; GASPAR, M.; SILVA, M. J.; OTTOBONI, L. M. M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A. P. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analysis. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 475-482, 1999.

STUBER, C. W.; POLACCO, M.; SENIOR, L. M. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1571-1583, 1999.

UEXKULL, 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**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 5-19.

Apoio: FAPEMIG

