

# Novas regiões genômicas associadas com tolerância ao alumínio em uma população de milho do Quênia

Guimarães, RGN<sup>1</sup>, Matonyei, T<sup>2</sup>; Tinoco, CFS<sup>3</sup>; Ligeio, D<sup>4</sup>; Mendes FF<sup>5</sup>, Magalhães, JV<sup>6</sup>; Ouma, E<sup>2</sup>; Gudu, S<sup>2,7</sup>; Guimarães, CT<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Sete Lagoas, MG – Bolsista PIBIC, CNPq

<sup>2</sup>Moi University, Eldoret, Kenya

<sup>3</sup>Centro Universitário UNIFEMM, Sete Lagoas, MG – Bolsista BAT, FAPEMIG

<sup>4</sup>Kenyan Agriculture Research Institute, Kitale, Kenya

<sup>5</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Bolsista Recém-Doutor, CNPq

<sup>6</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Pesquisador

<sup>7</sup>Rongo University College, Rongo, Kenya

roberta.gra@hotmail.com

Keywords: root growth, nutrient solution, *MATE*, SNPs, *Nrat1*

## INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo e de grande importância econômica e social, sendo utilizado para a alimentação humana, animal e como fonte de biocombustível (Awika et al., 2011). No Quênia, o setor da agricultura é responsável por 1/3 do produto interno bruto (Oluoch-Kosura, 1999). Segundo a Rede de Sistemas de Alerta de Fome (2014), com exceção de escassas áreas, todo o país sofre uma situação de insegurança alimentar, pois na última colheita de milho, o alimento básico no Quênia, não foi suficiente para alimentar toda a população.

Da área total do Quênia, 16% são classificados como de alto a médio potencial para a produção agrícola, sendo que os outros 84% são constituídos por terras áridas e semi-áridas. Solos ácidos são comuns em regiões tropicais, onde a produção de grãos é baixa comparada com o rendimento potencial das culturas (Oluoch-Kosura, 1999). Nesses solos, a presença de alumínio (Al) inibe o crescimento da raiz, impedindo que a planta obtenha água e nutrientes necessários ao seu desenvolvimento ideal. Isso ocorre porque o Al é solubilizado na solução do solo na forma de cátion trivalente (Al<sup>3+</sup>), sendo altamente tóxico às raízes (Kochian, 1995).

Apesar de haver estratégias agronômicas capazes de aumentar o pH do solo, elas não são efetivas nas camadas subsuperficiais e

umentam o custo de produção. Assim, uma forma economicamente viável para o desenvolvimento agrícola em solos ácidos consiste na identificação de regiões genômicas associadas com a tolerância ao Al, buscando compreender os mecanismos moleculares que conferem tal característica (Foy, 1984).

Vários genes de tolerância ao Al já foram identificados e caracterizados em plantas, incluindo transportadores de ácidos orgânicos, transportadores do tipo ABC, transportadores de Al<sup>3+</sup> e fatores de transcrição. Membros da família *MATE* demonstraram mediar a exsudação de citrato ativado por Al em algumas espécies de plantas, incluindo o sorgo (Magalhães et al., 2007). Um homólogo funcional ao gene de sorgo, *SbMATE*, foi caracterizado em milho, *ZmMATE1*, colocalizando com um QTL de efeito maior para a tolerância ao Al no cromossomo 6 (Maron et al., 2010; 2013).

A população utilizada no presente trabalho foi derivada de linhagens do programa de melhoramento de milho do Quênia, representando um germoplasma até então inexplorado do ponto de vista genético-molecular como fonte de tolerância ao Al. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar regiões genômicas associadas com a tolerância ao Al em uma população segregante de milho originária do Quênia.

## MATERIAL E MÉTODOS

Material genético- Foram utilizadas 180 famílias F<sub>2:3</sub> derivadas de um cruzamento entre duas linhagens de milho contrastantes para a tolerância ao Al do Quênia, 203B-14 e SCH3. A linhagem 203B-14 apresenta alta tolerância ao Al, equivalente à tolerância de Cateto Al237, linhagem considerada como padrão de tolerância no Brasil. Já a SCH3 é uma linhagem com atributos agrônômicos para o programa de melhoramento do Quênia e possui sensibilidade ao Al semelhante à L53, utilizada como controle sensível no Brasil.

**Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva-** O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura controlada 25/27 °C dia/noite e umidade relativa de 75%. As sementes foram desinfestadas com 0,5% de hipoclorito de sódio durante 5 minutos, enxaguadas com água deionizada e germinadas durante três dias em rolos de papel de germinação umedecidos. As plântulas foram transferidas para copos de polietileno e mantidas em solução nutritiva descrita por Magnavaca et al. (1987) com pH 4,0 sob aeração contínua. Após uma aclimatização em solução nutritiva completa sem Al durante 24 h, o comprimento inicial da raiz seminal (CIRS) foi medido em todas as plântulas, que foram transferidas para bandejas contendo solução nutritiva com atividade {39} µM Al<sup>3+</sup> ou sem Al, pH 4,0. Depois de crescer por cinco dias, o comprimento final da raiz seminal (CFRS) foi medido. A tolerância foi avaliada como o crescimento relativo de raiz seminal (RNRG) medido como (CFRS - CIRS) com Al dividido por (CFRS - CIRS) sem Al.

As progênies foram avaliadas em seis experimentos em delineamento em blocos casualizados com três repetições, e duas linhagens, L53 e Cateto Al237, foram utilizadas como testemunhas comuns em cada experimento. A análise de variância dos dados fenotípicos foi realizada utilizando Proc GLM (SAS Institute, Inc., 1999). A herdabilidade foi calculada com base nas médias dos genótipos.

**Marcadores moleculares-** O DNA foi isolado a partir de folhas jovens, utilizando o método de CTAB (Saghai-Marooft et al., 1984). As reações de PCR para os marcadores microssatélites não fluorescentes foram realizadas de acordo com Ninamango-Cárdenas et al. (2003), e os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em géis de

poliacrilamida a 10% e corados com prata. Imagens obtidas foram fotografadas sob luz branca em sistema de imagem Kodak. As sequências dos iniciadores e localização genômica dos SSRs foram obtidas no Maize Genetics and Genomic Database (<http://www.maizegdb.org/>). Os SNPs foram mapeados na população usando Kompetitive Allele-Specific PCR, denominado de ensaio KASP por meio da empresa LGC Genomics ([www.lgcgenomics.com](http://www.lgcgenomics.com)). A informação da sequência e posição física de SNPs estão disponíveis no Panzea ([http://www.panzea.org/db/searches/webform/marker\\_search](http://www.panzea.org/db/searches/webform/marker_search)).

A reação de amplificação de microssatélites com iniciadores fluorescentes foi realizada com 50 ng de DNA, tampão 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 166 µM de cada dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume total de 15 µL. Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguidos por oito ciclos a 94 °C durante 20 segundos, 60 °C (-1 °C/ciclo) durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de amplificação a 94 °C durante 20 segundos, 53 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 1 minuto, com um passo de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Após a PCR, as reações foram diluídas em água (1:100), sendo misturados 2 µL de cada uma das amostras juntamente com 0,3 µL de GeneTAB500 (GeneID) e 9,7 µL de Tween 20 0,1%. A mistura foi desnaturada a 94 °C por 5 minutos e transferida para um banho de gelo antes da aplicação. A eletroforese capilar foi realizada em MegaBace 1000 (Amersham Biosciences), utilizando a injeção com 3kV por 45 segundos e corrida a 10kV por 75 minutos. Os resultados foram avaliados no software Fragment Profile 1.2 (Amersham Biosciences).

**Mapa Genético-** Os marcadores foram testados para a segregação esperada de 1:2:1 usando estatística qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). O mapa genético foi construído utilizando o software MAPMAKER / EXP 3.0b (Lander et al., 1987) com LOD mínimo de 3 e fração de recombinação máxima de 0,40. A fração de recombinação foi convertida em distância genética por meio da função Kosambi (Kosambi, 1944).

**Mapeamento de QTLs-** Foi realizado utilizando o mapeamento de intervalo múltiplo

(MIM) proposto por Kao et al. (1999) e implementado pelo QTL Cartographer 2.5 para Windows (Wang et al., 2012). O modelo final MIM foi selecionado após várias rodadas de ajustes dos efeitos principais e das interações entre QTLs com base no critério de *Bayesian Information Content* (BIC). A posição, os efeitos e a proporção da variância genética explicada pelos QTLs individuais, bem como o  $R^2$  total do modelo, foram obtidos pelo MIM. Os intervalos de confiança foram estabelecidos como um intervalo de suporte LOD (Lander & Botstein, 1989).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

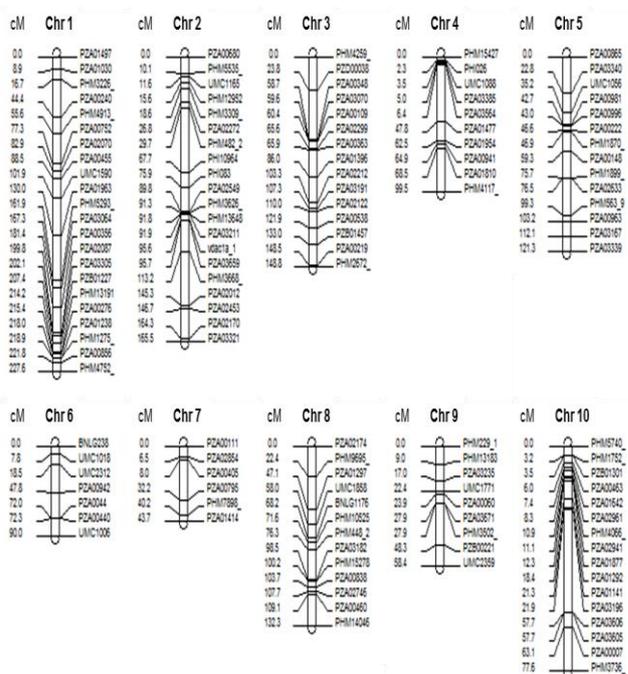
A tolerância ao alumínio (Al) com base no crescimento relativo de raiz seminal (RNRG) apresentou uma ampla variabilidade genética, com baixo coeficiente de variação (8,82%) e alta herdabilidade (97,07%). Esses resultados indicam que a população alvo é adequada para análise de QTL e que os dados fenotípicos possuem alta confiabilidade (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Análise de variância agrupada com testemunhas comuns para a tolerância ao Al na população de mapeamento.

Fonte de Variação	DF	Quadrado Médio
Rep/Experimento	12	26,86
Experimento(E)	5	1650,29**
Controle X E	5	103,66**
Genótipos ajustados	183	715,48**
Controles	1	50912,12**
Genótipos/E	176	357,79**
(Controle x Genótipo)/E	6	2841,73**
Resíduo	376	10,49
Média Geral		36,72
Média dos Genótipos		35,34
Média dos Controles		57,61
CV(%)		8,82
Herdabilidade (%)		97,07

\*\* significativo a 1% pelo teste F

Os 132 marcadores polimórficos foram ordenados ao longo dos 10 grupos de ligação e cobriram 1164,7 centiMorgans (cM) do genoma do milho, com uma média de um marcador a cada 9 cM. Desses marcadores, 117 foram do tipo SNPs e 15 SSRs (Figura 1).



**Figura 1.** Mapa genético construído com 132 marcadores moleculares.

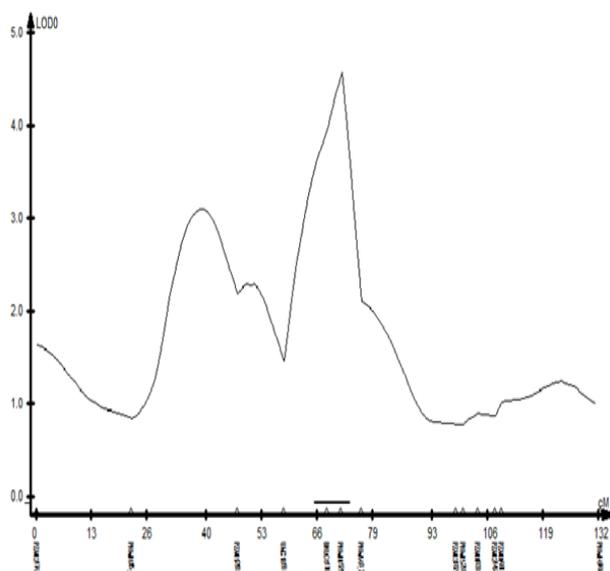
Um total de cinco QTLs foi associado com a tolerância ao Al nos cromossomos 1, 5, 8, 9 e 10, explicando aproximadamente 47% da variação fenotípica para RNRG, incluindo efeitos epistáticos (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** QTLs associados com tolerância ao Al utilizando o mapeamento por intervalos múltiplos.

QTL	Cro	Marcador	Posição (cM)	Tipo	LOD	Efeito	$R^2$ (%)
1	1	PZA00356_8	184.4	A	4.5	4.060	6.3
				D	1.9	-3.859	3.4
2	5	PZA00222_7	46.6	A	2.9	3.211	3.9
				D	1.3	2.878	1.5
3	8	PHM10525_11	71.6	A	0.1	-0.568	0.4
				D	2.0	-3.580	3.6
4	9	PHM229_15	2	A	2.3	-3.095	4.1
				D	1.1	-2.882	1.0
5	10	PHM1752_36	3.2	A	3.8	3.406	5.8
				D	0.2	1.130	0.3
<b>Interações</b>							
	1x3			DD	2.6	9.197	5.6
	1x4			DA	2.2	6.549	4.8
	1x5			DA	2.3	-6.155	4.2
	1x5			AA	1.0	3.179	1.8
<b>Total <math>R^2</math> (%)</b>							<b>46.74</b>

Foram identificados QTLs com efeitos aditivos e devido à dominância, explicando

relativamente pequena proporção da variância genotípica da tolerância ao Al. Já os efeitos epistáticos foram significativos e com elevada importância, sendo comparável aos efeitos principais. Os QTLs identificados nos cromossomos 5, 8 e 10 são coincidentes com regiões previamente associadas com a tolerância ao Al em outros trabalhos (Sibov et al., 1999; Ninamango et al., 2003; Conceição et al., 2009). Dentre eles, podemos ressaltar o QTL mapeado no cromossomo 5, cuja região genômica co-localiza com o gene *ZmNrat1*, previamente associado a tolerância ao Al em milho por Guimarães et al. (2014) (**Figura 2**). O gene *ZmNrat1* é homólogo ao *OsNrat1*, que codifica um transportador de  $Al^{3+}$  associado a tolerância ao Al em arroz. Curiosamente, nenhum QTL de tolerância ao Al foi detectado no cromossomo 6, onde um QTL de efeito maior foi mapeado em uma população de RILs derivada da linhagem brasileira Cateto Al237 (Guimaraes et al., 2014). No entanto, novas regiões genômicas foram identificadas nos cromossomos 1 e 9.



**Figura 2.** QTL de tolerância ao Al mapeado no cromossomo 5, co-localizado com o gene candidato *ZmNrat1*.

## CONCLUSÃO

Foi possível identificar novas regiões genômicas associadas à tolerância ao Al, sendo confirmados outros QTLs, incluindo a co-localização com o gene *ZmNrat1*, será investigado em estudos posteriores.

## PRODUÇÃO INTELECTUAL E PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS/CURSOS

Resumo simples apresentado no 59º Congresso Brasileiro de Genética em 2013: Genomic regions associated with aluminum tolerance in a Kenyan maize line.

Resumo e seminário apresentados no V Seminário de Iniciação Científica PIBIC e BIC JUNIOR na Embrapa Milho e Sorgo em 2013: Mapeamento de QTLs Associados com Tolerância ao Alumínio em Milho,

Participação do XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo em 2013.

## REFERÊNCIAS

- Awika JM (2011) Major cereal grains production and use around the world. In Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion. Edited by Awika JM, Piironen V, Bean S. Washington: American Chemical Society, p. 1–13.
- Conceicao LDHCS, Tessele C, Barbosa Neto JF (2009) Diallel analysis and mapping of aluminum tolerance in corn inbred lines. *Maydica* 54:51- 64.
- Foy CD (1984) Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: Adams, F. (Ed.) Soil acidity and liming. 2. ed. Madison: Soil Science Society American, p. 57-97.
- Guimaraes CT, Simoes CC, Pastina MM, Maron LG, Magalhaes JV, et al. (2014) Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics*, 15:153.
- Kao CH, Zeng ZB, Teasdale RD (1999) Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 132:1203-1216.
- Kochian LV (1995) Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 46: 237-260.
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugenics.* 12:172-175.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-81

- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UG, et al. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.* 39: 1156-1161.
- Magnacava R, Gardner CO, Clark RB (1987) Evaluation of inbred maize lines for aluminum in nutrient solution. In: H.W. Gabelman & B.C. Loughman (Eds.), *Genetics Aspects of Plant Mineral Nutrition*, pp. 255–265. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
- Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, et al. (2010). Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant J.* 61: 728-740.
- Maron LG, Guimarães CT, Kirst M, Albert PS, Birchler JA, et al. (2013) Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *PNAS*, 11.
- Ninamango-Cárdenas FE, Guimarães CT, Martins PR, Parentoni SN, Carneiro NP, Paiva E (2003) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica* 130:223-232.
- Oluoch-Kosura W (1999) Intensification: Best option for Agricultural growth in Kenya. *AgriForum* 9:9- 11
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:8014-8018.
- Sibov ST, Gaspar MJ, Ottoboni LMM, Arruda P, Souza AP (1999) Two genes controlling aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome*, 42:475- 482.
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2012) *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.

