

Obtenção de linhagens-elites de milho introgridas com o gene *ZmMATE1* que confere tolerância ao alumínio¹

Leandro da Cunha Apolinário², Marcos de Oliveira Pinto³, Beatriz de Almeida Barros³, Lauro José Moreira Guimarães⁴, Jurandir Vieira de Magalhães⁴, Claudia Teixeira Guimarães⁴

¹ Trabalho financiado pela Fapemig, GCP, CNPq e Embrapa

² Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio Fapemig/Embrapa

³ Analista de Pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo

⁴ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Vigência da bolsa:

07/03/2017 a 28/02/2018

Introdução

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo desde o surgimento da agricultura. A grande importância econômica, social e cultural do milho é caracterizada pela sua versatilidade no uso alimentar tanto humano quanto animal, além da sua adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas (Garcia et al., 2008; Môro; Fritsche-Neto, 2015). Os principais países produtores de milho são, em ordem decrescente, Estados Unidos, China, Brasil e Argentina, sendo o Brasil, o terceiro maior produtor e o segundo maior exportador mundial do grão (Safra..., 2017).

Apesar dos aumentos na produção de milho, o potencial de produtividade dessa cultura no país é limitado por fatores bióticos e abióticos, dos quais podemos ressaltar a toxicidade causada pelo alumínio (Al). Em solos ácidos, o Al está presente na forma de cátion trivalente (Al^{3+}), que é altamente tóxica e inibe o crescimento radicular (Kochian et al., 2015), limitando a aquisição de nutrientes e água do solo (Wang et al., 2006). A utilização de genótipos tolerantes ao Al, associado com práticas agrônômicas, tem sido uma estratégia para o cultivo agrícola em solos ácidos (Coelho, 2015).

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). No entanto, Maron et al. (2010) identificaram e caracterizaram um membro da família MATE, *ZmMATE1*, como o gene responsável por um QTL (*Quantitative Trait Loci*) mapeado

no cromossomo 6 explicando 16% da tolerância ao Al em uma população de linhagens recombinantes em milho.

Essa região genômica, denominada *qALT6*, foi introgridida em uma linhagem sensível ao Al, resultando em um aumento de duas vezes na tolerância ao Al (Guimarães et al., 2014). Como o alelo que aumenta a tolerância ao Al é derivado de Cateto Al237, uma linhagem sem atributos agronômicos, é importante que o background genético da linhagem recorrente seja recuperado de forma rápida e eficiente. Para isso, o método mais recomendado é o retrocruzamento assistido por marcadores, que é realizado em duas etapas: uma utilizando marcadores específicos para o alelo de interesse e outra utilizando marcadores aleatórios no genoma.

Assim, o objetivo do presente estudo consistiu na introgressão do gene *ZmMATE1* em linhagens-elites de milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores, visando elevar a tolerância ao Al nessas linhagens.

Material e Métodos

Materiais genéticos

As linhagens-elites utilizadas como recorrentes foram L3, L262841-1-4-1, L2841 e 521529, pertencentes ao programa de melhoramento de milho da Embrapa, representando grupos heteróticos diferentes e níveis de tolerância ao Al. A linhagem doadora foi a NIL13, cujo alelo de tolerância do *ZmMATE1* foi derivado da Cateto Al237 (Guimarães et al., 2014).

As progênies F1 foram obtidas a partir do cruzamento entre as linhagens-elites e a NIL13, sendo retrocruzadas com as respectivas linhagens recorrentes. As progênies RC1, RC2, RC3 e RC3F2 foram obtidas, sendo que apenas as progênies RC3 e RC3F2 foram genotipadas no presente trabalho.

Genotipagem com marcadores moleculares

A extração do DNA foi realizada a partir de discos foliares, conforme a metodologia descrita por Lana et al. (2010).

A genotipagem foi realizada em duas etapas: uma utilizando o marcador alelo-específico convertido para o ensaio KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*) desenvolvido com base em um SNP localizado na região promotora do *ZmMATE1* (Barros et al., 2016). O ensaio diferencia o alelo superior do gene *ZmMATE1* derivado de Cateto Al237, do alelo derivado das demais linhagens. A reação de PCR foi realizada

com um volume final de 6 µL, utilizando 30 ng de DNA, segundo as recomendações do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas em *touchdown*: Desnaturação inicial a 94 °C por 15'; 10 ciclos de 94 °C por 20", 61 °C (com redução de 0,6 °C por ciclo até 55 °C) por 1', 26 ciclos de 94 °C por 20" e 55 °C por 1'. O resultado final foi analisado no leitor de fluorescência Fluostar Omega e a genotipagem foi feita no programa KlusterCaller versão 3.2.3.

Na segunda etapa, as plantas RC3 heterozigotas para o gene *ZmMATE1* foram selecionadas e genotipadas com marcadores SNPs para a seleção daquelas com maior proporção do genoma recorrente. De uma a duas plantas selecionadas foram autofecundadas para obtenção das progênes RC3F2. Em torno de 18 a 27 marcadores foram utilizados para cada uma das linhagens-elites introgrididas, em função do polimorfismo entre as linhagens recorrentes e a doadora.

As progênes RC3F2 foram genotipadas apenas com o marcador alelo-específico do *ZmMATE1* para identificar as plantas contendo o gene em homozigose para ambos os alelos.

Análise dos dados

A porcentagem do genoma recorrente recuperado para as linhagens foi calculada considerando $A + \frac{1}{2} H$ / número de marcadores, sendo A: homozigotos para o alelo da linhagem recorrente e H: heterozigotos.

Resultados e Discussão

Introgressão do ZmMATE1

A disponibilidade de um marcador de fácil execução e visualização permitiu a seleção rápida e eficiente dos indivíduos de interesse em cada geração. Na geração RC3, foram selecionados os indivíduos heterozigotos (pontos verdes) (Figura 1A). Já na progênie RC₃F₂, foram selecionados os indivíduos homozigotos para o alelo de tolerância derivado de Cateto Al237 (pontos vermelhos) e para o alelo de sensibilidade (pontos azuis) na Figura 1B. Assim, o marcador foi capaz de distinguir os alelos do gene *ZmMATE1*, sendo uma importante ferramenta para o programa de seleção assistida visando aumentar a tolerância à toxicidade ao alumínio.

A

B

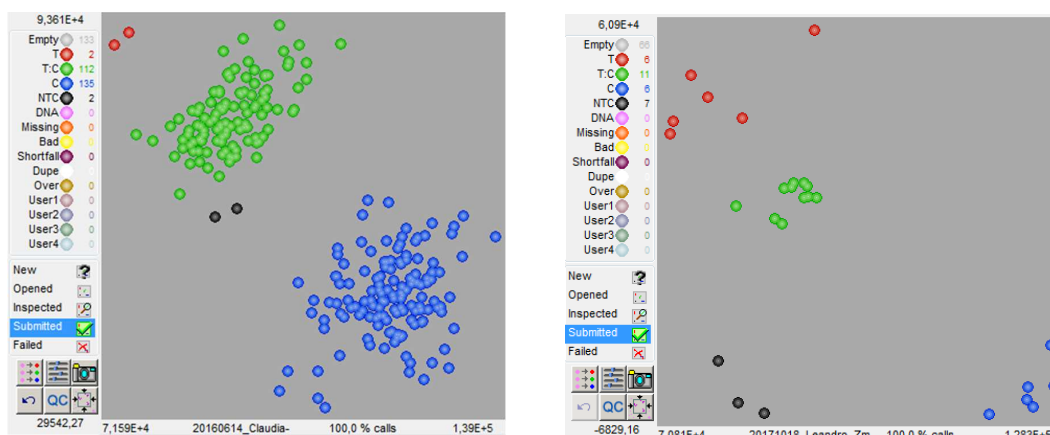


Figura 1-Genotipagem realizada com marcador alelo-específico para o gene *ZmMATE1* utilizando o ensaio KASP no programa KlusterCaller. A: Genotipagem de progênies RC3 diferenciando as plantas heterozigotas (pontos verdes) das homozigotas para o alelo da linhagem recorrente (pontos azuis). B: Genotipagem de progênies RC3F2 diferenciando as três classes genotípicas: homozigotas para o alelo doador (pontos vermelhos), heterozigotas e homozigotas para o alelo recorrente. Os pontos pretos representam o controle branco.

Recuperação do genoma recorrente

Para a recuperação do genoma recorrente, as progênies RC1, RC2 e RC3 foram genotipadas com 18 a 27 marcadores SNPs distribuídos ao longo de todos os cromossomos do milho. Assim, as progênies RC3 apresentaram entre 95 e 98% do genoma das linhagens recorrentes recuperado, o que equivale à média de recuperação do genoma recorrente em RC4. As progênies serão caracterizadas quanto à tolerância ao Al e à expressão do gene *ZmMATE1*. Como a introgressão desse gene na L53 dobrou a tolerância ao Al nas NILs (Guimarães et al., 2014), espera-se um aumento da tolerância nas linhagens introgrididas. Essas linhagens serão caracterizadas molecular e fisiologicamente para avaliar o ganho na tolerância ao Al que, conseqüentemente, trará um aumento na estabilidade de produção em híbridos de milho cultivados em solos ácidos.

Conclusão

O gene *ZmMATE1* foi introgridido com sucesso em quatro linhagens-elites de milho, de forma rápida e eficiente utilizando marcadores moleculares.

Referências

BARROS, B. de A.; MITRE, L. K.; PINTO, M. de O.; MAGALHAES, J. V. de; GUIMARAES, L. J. M.; GUIMARAES, C. T. Marcador alelo-específico associado com níveis de expressão do gene Zm MATE1 em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 31., 2016, Bento Gonçalves. **Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais**. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016. p. 127-129.

COELHO, C. J. **Tolerância ao alumínio em milho tropical: herança genética, mapeamento de QTLs e expressão gênica**. 2015. 102 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2015.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. de O.; CRUZ, J. C.; PADRÃO, G. de A. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 1, p. 21-46.

GUIMARÃES, C. T.; SIMOES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHAES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; GUIMARAES, L. J. M.; LANA, U. G. de P.; TINOCO, C. F. S.; NODA, R. W.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, v. 15, n. 153, p. 1-14, 2014.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHAES, 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.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, 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).

LIMA, M.; MIRANDA-FILHO, J. B.; FURLANI, P. R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Revista Brasileira de Genética**, 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.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.

MARON, L.; PIÑEROS, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; PLEIMAN, J. K.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transports potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MÔRO, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Importância e usos do milho no Brasil. In: BOREM, A.; GALVÃO, J. C. C.; PIMENTEL, M. A. (Ed.). **Milho: do plantio à colheita**. Viçosa: Ed. UFV, 2015. p. 9-25.

SAFRA mundial de milho 2016/17: 12º levantamento do USDA. **Informativo DEAGRO**, abr. 2017. Disponível em: <<http://www.fiesp.com.br/arquivo-download/?id=229578>>. Acesso em: 13 jan. 2018.

WANG, J. P.; RAMAN, H.; ZHANG, G. P.; MENDHAM, N.; ZHOU, M. X. Aluminum tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 10, p. 769-787, 2006.