

## Caracterização de germoplasma de milho quanto à tolerância ao alumínio<sup>1</sup>

Gabriela Stefane Barbosa Mendes<sup>2</sup>, Rayanne Pereira de Oliveira<sup>3</sup>, Beatriz de Almeida Barros<sup>4</sup>, Jurandir Vieira de Magalhães<sup>5</sup>, Cláudia Teixeira Guimarães<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Trabalho financiado pelo CNPq. <sup>2</sup> Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa. <sup>3</sup> Bolsista da Fapemig, Embrapa Milho e Sorgo. <sup>4</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo. <sup>5</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

### Introdução

O milho é um cereal de fundamental importância na alimentação animal e humana, além de ser indispensável para vários setores da indústria. A produção de milho em 2018 foi de aproximadamente 1 bilhão de toneladas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor no mercado internacional (FAO, 2020). No entanto, na ausência de correção química do solo, a cultura do milho sofre influência negativa dos altos níveis de saturação de alumínio (Al), presente na maioria dos solos brasileiros (Souza et al., 2019).

O Brasil possui grandes áreas com solos ácidos, que apresentam alta saturação de Al, incluindo o Cerrado, que possui grande participação no setor agrícola, com destaque para o cultivo do milho. A presença do Al tóxico danifica o sistema radicular, limitando a absorção de água e nutrientes (Kochian et al., 2015), que, conseqüentemente, reduz o crescimento das plantas. As plantas possuem diferentes mecanismos de tolerância ao Al, que culminaram na caracterização de vários genes envolvidos nesses mecanismos (Kochian et al., 2015). Em milho, apenas o gene *ZmMATE1* foi identificado como responsável por 16 a 30% da tolerância ao Al em populações segregantes (Maron et al., 2010; Guimarães et al., 2014). O gene *ZmMATE1* codifica um transportador de membrana, que promove a exsudação do ácido orgânico citrato no ápice radicular das linhagens tolerantes (Maron et al., 2010), restringindo a entrada do Al nas células da raiz. Recentemente, um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) localizado na região promotora do *ZmMATE1* foi associado com a expressão desse gene (Barros et al., 2016), sugerindo um possível efeito na tolerância ao Al.

Considerando a importância dessa característica e que os resultados sobre o gene *ZmMATE1* foram obtidos a partir de um conjunto restrito de linhagens de milho pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa, o objetivo do presente trabalho foi explorar a variabilidade genética existente em um amplo grupo de linhagens-elites e

de acessos do banco de germoplasma de milho da Embrapa quanto à resposta ao Al em solução nutritiva.

## **Material e Métodos**

### **Germoplasma**

Foram utilizados 80 genótipos de milho, incluindo linhagens-elites do programa de melhoramento e acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Milho e Sorgo. As linhagens utilizadas como testemunhas foram Cateto Al237, como altamente tolerante ao Al, e L53, sensível ao Al.

### **Tolerância ao Al em Solução Nutritiva**

As sementes foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 5%, em agitação constante por 5 min, enxaguadas com água deionizada e em germinadas em papel de germinação por quatro dias, sendo 24 h a 30 °C, e em seguida mantidas por três dias na câmara de crescimento. Plântulas homogêneas foram colocadas em copos de polietileno e em contato com a solução nutritiva descrita por Magnavaca et al. (1987), com pH ajustado para 4,0 e aeração constante. O experimento foi conduzido na câmara de crescimento com fotoperíodos de 12 h e temperatura de 27 °C durante o dia e 21 °C durante a noite.

As plântulas foram mantidas por 24 h em solução nutritiva sem Al para aclimatação, e a raiz seminal de todas as plântulas foi medida, gerando o dado de comprimento inicial (CI). Em seguida, metade das plântulas foi mantida na solução sem Al e metade, transferida para solução nutritiva contendo  $39 \mu\text{M}$  de atividade de  $\text{Al}^{3+}$ . Após cinco dias da medição inicial, as raízes foram medidas novamente, gerando o comprimento final (CF) das raízes. O crescimento das raízes foi avaliado pela diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial, obtendo o crescimento líquido da raiz (CLR) na solução nutritiva com e sem alumínio. A tolerância ao Al foi avaliada pela razão entre o CLR (com Al) e o CLR (sem Al) multiplicado por 100, que equivale ao Crescimento Relativo da Raiz (CRR) em porcentagem.

Foram realizados seis experimentos delineados em blocos casualizado com três repetições, sete plantas por repetição, tendo as linhagens Cateto Al237 e L53 como testemunhas comuns entre os experimentos. A análise estatística foi realizada por meio da análise agrupada em blocos, e as médias ajustadas do CRR (%) foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% utilizando o programa Genes (Cruz, 2016).

### **Genotipagem por marcador molecular do SNP (Polimorfismo de nucleotídeo único) na região promotora do gene *ZmMATE1***

Folhas de sete plântulas foram utilizadas para representar cada genótipo, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a extração do DNA. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB descrito por Saghai-Marrof et al.

(1984), quantificado por meio do NanoDrop 1000 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA) e diluído para a concentração de 20 ng/ $\mu$ L.

O SNP foi revelado pelo ensaio do tipo KASP (Kompetitive Allelic-Specific Primers) desenvolvido pela LGC Genomics, Teddington, Inglaterra. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 60 ng do DNA, 14  $\mu$ L do KASP Assay Mix 2x com os primers de interesse e 0,5  $\mu$ L de KASP Master Mix 54x. A amplificação foi realizada com 36 ciclos: 10 ciclos a 94 °C por 20 s e 26 ciclos a 94 °C por 20 s e 55 °C por 1 min, acrescidos de 26 ciclos a 94 °C por 20 s e 55 °C por 1 min. A fluorescência das reações foi quantificada em leitor de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech Ortenberg Alemanha) e convertida na genotipagem com o auxílio do programa KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics, Teddington, Inglaterra).

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os genótipos de milho, as respectivas origens, os resultados da tolerância ao Al com base nas médias ajustadas do CRR (%), seguido do teste de médias Scott-Knott e a genotipagem do SNP localizado na região promotora do gene *ZmMATE1*. De forma geral, entre um conjunto de 80 genótipos de milho amplamente diverso, verificou-se uma correlação moderada ( $r = 0,47$ ) entre a presença do genótipo homozigoto TT do SNP na região promotora do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao Al, indicando a contribuição significativa desse gene, além do envolvimento de outros fatores genéticos na tolerância ao Al em milho. Tal resultado corrobora com informações previamente publicadas tanto em relação ao efeito do gene *ZmMATE1* quanto à complexidade da tolerância ao Al em milho (Maron et al., 2010; Guimarães et al., 2014; Kochian et al., 2015).

A linhagem Cateto Al237 é a fonte de tolerância ao Al da qual foi clonado o gene *ZmMATE1*, que confere tolerância ao Al em milho (Maron et al., 2010). Esse gene é organizado em três cópias no genoma da Cateto Al237 (Maron et al., 2013), que possui o genótipo homozigoto TT do SNP na região promotora do gene, que está associado com a sua expressão induzida por Al no ápice radicular (Barros et al., 2016). Essa linhagem foi agrupada com os genótipos de milho altamente tolerantes ao Al, juntamente com outros acessos da raça Cateto do banco de germoplasma, que também apresentaram o genótipo homozigoto TT do SNP, sugerindo que o alelo superior do gene *ZmMATE1* é prevalente na raça Cateto e contribui para os altos níveis de tolerância ao Al em milho. Por outro lado, Cateto Colômbia 9671 apresentou o genótipo homozigoto CC do SNP e sensibilidade intermediária ao Al. No grupo de linhagens altamente tolerantes ao Al, a linhagem Piracicaba04\_05 foi destaque e apresentou o genótipo CC do SNP, indicando que essa linhagem não possui o alelo superior do gene *ZmMATE1* e pode ser utilizada como fonte de novos genes de tolerância ao Al.

A linhagem-élite do programa de melhoramento da Embrapa, L228-3, foi caracterizada por Guimarães et al. (2014), como portando o genótipo TT do SNP, alta

expressão do gene *ZmMATE1*, mas apenas uma cópia do gene, diferente das três cópias apresentadas por Cateto Al237. A L228-3 e as suas 29 linhagens-elites derivadas apresentaram uma tendência daquelas com o genótipo homocigoto TT do SNP serem mais tolerantes ao Al em comparação com aquelas com o genótipo homocigoto CC do SNP (Dados não mostrados).

Dentro do conjunto de linhagens-elites do programa de melhoramento, foram identificadas seis novas fontes do genótipo homocigoto TT do SNP, sendo duas delas com altos níveis de tolerância ao Al (580056\_8 e 5100317\_5). Em um conjunto de linhagens do CIMMYT, duas linhagens portando o genótipo homocigoto TT do SNP foram identificadas, sendo uma com alta tolerância ao Al (CLA321) e a outra com tolerância intermediária (CML451).

A L228-3 é derivada da raça Tuxpeño, e dentre os 11 acessos dessa raça obtidos do BAG, apenas dois deles apresentaram alta tolerância ao Al (CRR de 78 a 93%), sendo todos eles portadores do genótipo homocigoto CC do SNP, indicando não ser a origem do genótipo TT da linhagem L228-3. Adicionalmente, os acessos Tuxpeños introduzidos do México foram mais sensíveis ao Al do que os acessos Tuxpeños derivados de programa de melhoramento no Brasil, confirmando a hipótese levantada por Maron et al. (2013) de que o alelo superior do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao Al provêm de ciclos de seleção em regiões de solos ácidos do Brasil.

**Tabela 1.** Genótipos de milho, linhagens e acessos (realçados com A), respectivas origens, tolerância ao alumínio (CRR), teste de Scott-Knott e genotipagem para o SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.

Genótipo	Origem	CRR (%)	Scott-Knott	SNP T/C
Cateto Al237	Instituto Agronômico BH	104.27	A	TT
Cateto Composto São Simão	ESALQ/USP (A)	100.55	A	TT
Cateto Composto Botucatu	ESALQ/USP (A)	100.54	A	TT
Composto Racial Cateto I	Germoplasma (A)	99.50	A	TT
Cat100-6	Unicamp	96.49	A	TT
Piracicaba 04_05	ESALQ/USP	109.55	A	CC
Cateto Colômbia 9671	Colômbia	40.09	E	CC
L228-3	Tuxpeño	76.13	C	TT
L19	Tuxpeño	59.57	d	TT
L22	Tuxpeño	37.01	E	TT
L18	Tuxpeño	23.66	F	CC
580056_8	L31113-01-1-4	90.46	b	TT
5100317_5	L31113-01-1-4	82.23	C	TT
L30E	CMS36	55.47	d	TT
541358	Sintético Elite	49.28	d	TT

541350	Sintético Elite	41.10	E	TT
521573	Sintético Elite	34.24	E	TT
580035_2	Sintético Elite	87.87	b	CC
L22E	CMS36	84.54	b	CC
521538	Sintético Elite	72.44	C	CC
482041_30	Sintético Elite	66.40	C	CC
5100318_1	Sintético Elite	64.82	C	CC
L31113-01-1-4	Sintético Elite	58.80	d	CC
C3xD1_105_3	CMS14	58.19	d	CC
SLP181_71	CNPMS	55.71	d	CC
5100187_6	Sintético Elite	52.45	d	CC
371060_1	Sintético Elite	48.19	d	CC
5184180_04	Sintético Elite	45.01	d	CC
5133302016_08	Sintético Elite	42.16	E	CC
371056_1	Sintético Elite	43.60	E	CC
L53	BR111 Pool21	25.05	F	CC
SA1988-8/CLA321	CIMMYT	86.94	b	TT
SA2036-134/CML451	CIMMYT	54.35	d	TT
SA2007-41/CML444	CIMMYT	54.63	d	CC
SA1940-1/CLA84	CIMMYT	45.81	d	CC
WP 16 - Tuxpeño BR 2	ESALQ/USP (A)	93.13	b	CC
Tuxpeño 1 - BR108	BR108 - CNPMS	78.51	C	CC
WP 12 - Tuxpeño Flint	ESALQ/USP (A)	59.06	d	CC
Pool 25 Cerrado	CMS14 - CNPMS	52.33	d	CC
WP 20 - Tuxpeño Antigua	ESALQ/USP (A)	48.55	d	CC
Tuxpeño Branco - CMS08	CIMMYT-FD México (A)	45.67	d	CC
Compuesto Tuxpeño Veracruzano	CIMMYT-FD, México(A)	41.41	E	CC
WP 22 - Tuxpeño Peru RD	ESALQ/USP (A)	37.80	E	CC
WP 19 - Tuxpeño Cubano	ESALQ/USP (A)	37.26	E	CC
BR106	CNPMS	36.90	E	CC
Amarillo Dentado	CMS04 – CNPMS (A)	36.58	E	CC
Pool 25	CMS14 – CNPMS (A)	36.25	E	CC
Tuxpeño 1	CIMMYT-FD México (A)	33.43	E	CC
Tuxpeño F. F.	CIMMYT-FD México (A)	25.91	F	CC
Tuxpeño Caribe	CIMMYT-FD México (A)	24.30	F	CC
W22	Temperada	46.78	d	CC

## Conclusão

Novas fontes de tolerância ao Al foram identificadas entre as linhagens-elites e os acesso do BAG da Embrapa Milho e Sorgo, podendo servir como fontes de genes para estudos e para os programas de melhoramento.

Novas fontes do genótipo homocigoto TT do SNP na região promotora do gene *ZmMATE1* foram identificadas.

Verificou-se uma correlação moderada ( $r = 0,47$ ) entre a presença do genótipo homozigoto TT do SNP localizado na região promotora do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao Al, indicando que o gene contribui para a característica, entretanto, outros genes estão envolvidos na tolerância ao Al em milho.

## 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 *ZmMATE1* 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.

CRUZ, C. D. Genes Software: extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

FAO. **FAOSTAT - Food and agriculture data**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 30 maio 2020.

GUIMARÃES, C. T.; SIMÕES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHÃES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; GUIMARÃES, 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.; MAGALHÃES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. D.; CLARK, R. B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON GENETIC ASPECTS OF PLANT MINERAL NUTRITION, 2., 1985, Madison. **Proceedings**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 255-265.

MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. de; PLEIMAN, J. K.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. 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. **The Plant Journal**, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MARON, L. G.; GUIMARÃES, C. T.; KIRST, M.; ALBERT, P. S.; BIRCHLER, J. A.; BRADBURY, P. J.; BUCKLER, E. S.; COLUCCIO, A. E.; DANILOVA, T. V.; KUDMA, D.; MAGALHÃES, J. V.; PIÑEROS, M. A.; SCHATZ, M. C.; WING, R. A.; KOCHIAN, L. V. Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE 1



gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, 2013.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 24, p. 8014-8018, 1984.

SOUZA, A.; SALEH, A. M.; HABEEB, T. H.; YASSER, M. H.; ZRIEG, R.; WADAAN, M. A. M.; HOZZEIN, W. N.; SELIM, S.; MATOS, M.; ELGAWAD, H. A. Silicon dioxide nanoparticles ameliorate the phytotoxic hazards of aluminum in maize grown on acidic soil. **Science of the Total Environment**, v. 693, e133636, 2019.