

Associação de polimorfismos no gene *ZmMATE1* com a tolerância ao alumínio em genótipos de milho de ampla diversidade

Gabriela Stefane Barbosa Mendes², Rayanne Pereira de Oliveira³, Beatriz de Almeida Barros⁴, Jurandir Vieira de Magalhães⁵, Claudia Teixeira Guimarães⁵

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

Introdução

O milho é um cereal de fundamental importância na alimentação animal e humana, além de ser relevante para vários setores da indústria. A produção de milho em 2019 foi de 1,4 bilhão de toneladas, sendo o Brasil o terceiro maior produtor no mercado internacional (FAO, 2021). A expectativa de produção de milho no Brasil é de 85,7 milhões de toneladas para a safra 2020/2021, o que representa uma redução de 16,4% em relação à safra 2019/2020. Essa redução ocorre em função da perda de produtividade de 27% na segunda safra (Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, 2021), safra altamente influenciada pelas condições climáticas, com ênfase na distribuição de chuvas. A região agrícola brasileira possui uma prevalência de solos ácidos, que apresentam alta saturação de alumínio (Al). A presença do Al tóxico na solução do solo danifica o sistema radicular, limitando a absorção de água e nutrientes (Kochian et al., 2015), o que, conseqüentemente, reduz o desenvolvimento das plantas. Assim, o Al tóxico influencia negativamente a produção do milho no Brasil.

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 de citrato no ápice radicular das linhagens tolerantes (Maron et al., 2010), restringindo a entrada do Al nas células da raiz.

O aumento da expressão do gene *ZmMATE1* na presença do Al no ápice radicular é o mecanismo molecular responsável pelo aumento da tolerância ao Al conferido por esse gene em milho, que está associado com a presença de três cópias em tandem do gene (Maron et al., 2013). No entanto, Guimarães et al. (2014) identificaram linhagens de milho brasileiras com altos níveis de expressão do gene *ZmMATE1* e com apenas uma única cópia dele, sugerindo que outros mecanismos, além do número de cópias do gene, controlam os altos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*. Posteriormente, um polimorfismo de um nucleotídeo único, SNP, foi identificado na região promotora associado com a alta expressão do *ZmMATE1* em um conjunto reduzido de linhagens de milho brasileiras (Barros et al., 2016).

Assim, o presente trabalho explorou a variabilidade genética de linhagens-elites e de acessos do Banco de Germoplasma de Milho da Embrapa quanto à resposta ao Al em solução nutritiva, aos polimorfismos no gene *ZmMATE1* e aos níveis de sua expressão.

Materiais e Métodos

Materiais Genéticos

Foram utilizados 80 materiais genéticos de milho, incluindo linhagens-elites do programa de melhoramento e acessos do Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo. As linhagens utilizadas como testemunhas foram Cateto Al237, como altamente tolerante ao Al, e L53, como 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 minutos, enxaguadas com água deionizada e germinadas em papel de germinação por quatro dias, sendo 24 horas a 30 °C, e em seguida foram 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 horas e temperatura de 27 °C durante o dia e 21 °C durante a noite.

As plântulas foram mantidas por 24 horas 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 foi transferida para solução nutritiva contendo $39 \mu\text{M}$ de atividade de 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) multiplicada por 100, que equivale ao Crescimento Relativo da Raiz (CRR) em porcentagem.

Foram realizados seis experimentos delineados em blocos casualizados 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 do polimorfismo na região promotora do gene *ZmMATE1*

Folhas de sete plântulas foram utilizadas para representar cada genótipo, congeladas com auxílio do nitrogênio líquido e armazenadas no freezer a -80 °C até a extração do DNA. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB descrito por Saghai-Marooof et al. (1984) e quantificado com o auxílio do NanoDrop 1000 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA).

As reações de amplificação utilizaram 20 ng de DNA, 14 μL do KASP Assay Mix 2x com os primers e 0,5 μL de KASP Master Mix 54x. A amplificação foi realizada com 94 °C por 15 minutos, seguidos por 10 ciclos a 94 °C por 20 segundos, 61 °C durante 1 minuto reduzindo 0,6 °C por ciclo, acrescido por 26 ciclos a 94 °C por 20 segundos e 55 °C por 1 minuto. As reações foram avaliadas no leitor de fluorescências FLUOstar Omega (BMG Labtech Ortenberg Alemanha) e convertidas na genotipagem com o auxílio do programa KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics, Teddington, Inglaterra).

Quantificação do número de cópias do gene *ZmMATE1*

Linhagens com o alelo superior do gene *ZmMATE1*, identificadas por meio da genotipagem, foram avaliadas quanto ao número de cópias desse gene, utilizando o método de PCR quantitativo em tempo real de acordo com a metodologia proposta por Maron et al. (2013). A reação foi realizada com 100 ng do DNA, 5 μ L de Fast SYBR Green Master Mix e 16,6 μ L de cada primer. A amplificação foi realizada com 40 ciclos: um ciclo a 95 °C por 20 segundos para iniciar a amplificação e 39 ciclos a 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos. Os valores foram inseridos na fórmula $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ gene endógeno}$, o valor de ΔC_t gerado foi comparado ao valor de ΔC_t da amostra calibradora, a L53 sensível ao alumínio, gerando o valor de $\Delta \Delta C_t$, que foi usado na fórmula final $2^{-\Delta \Delta C_t}$, que é utilizada para a obtenção da quantificação do DNA.

Análise da expressão do gene *ZmMATE1*

O perfil de expressão do *ZmMATE1* foi avaliado nas mesmas condições da avaliação da tolerância ao Al, porém utilizando 1 cm do ápice radicular de plântulas cultivadas por 6 horas na solução nutritiva contendo $\{39\} \mu\text{M}$ de atividade de Al^{3+} . O RNA foi extraído de 14 ápices utilizando o kit SV Total RNA Isolation System, seguindo as especificações do fabricante. A síntese do cDNA seguiu o método da transcriptase reversa. Ao final as amostras foram quantificadas no NanoDrop 1000 e corridas em gel de agarose a 2% para análise da qualidade.

As amostras foram avaliadas pelo método de PCR quantitativo em tempo real, no equipamento 7500 Fast-Real Time PCR e utilizando a fluorescência SYBR Green. O cálculo da expressão relativa foi realizado pelo método $2^{-\Delta \Delta C_t}$ (Livak; Schmittgen, 2001) com três repetições técnicas para cada amostra biológica.

Resultados e Discussão

Os genótipos de milho apresentaram ampla variabilidade para tolerância ao Al, avaliada com base na porcentagem do crescimento relativo de raiz (CRR), sendo classificados em seis grupos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, desde altamente tolerantes (110%-95% CRR) até os altamente sensíveis (23%-31% CRR). Dentre os genótipos altamente tolerantes ao Al, além dos padrões de tolerância, Cateto Al237 e Cat100-6 (Maron et al., 2013), se destacaram três acessos Catetos do banco de germoplasma (Cateto Composto São Simão, Cateto Composto Botucatu e Composto Racial Cateto I) e a linhagem Piracicaba 04.05. Tal resultado confirma que a raça Cateto é uma fonte de tolerância ao Al e apresenta a linhagem Piracicaba 04.05 como fonte de novos genes de tolerância ao Al.

A presença do polimorfismo na região promotora do gene *ZmMATE1* (SNP T/C) foi altamente correlacionada com a expressão do gene ($r = 0,81$) (Figura 1A), indicando que o polimorfismo deve exercer um controle significativo na expressão do gene *ZmMATE1*, uma vez que a análise foi realizada em um conjunto de 80 genótipos de milho amplamente diversos. O alelo TT está associado com a alta expressão do gene *ZmMATE1*, indicando que esse polimorfismo pode ser utilizado como marcador para minerar a presença do alelo superior desse gene. No entanto, quatro linhagens da Embrapa e uma do CIMMYT apresentaram o alelo TT e baixa expressão do gene *ZmMATE1*, necessitando de uma maior investigação funcional para esse polimorfismo.

Por outro lado, o SNP T/C apresentou uma menor correlação com a tolerância ao Al ($r = 0,48$), realçando linhagens altamente tolerantes ao Al com o alelo CC e com baixa expressão do gene *ZmMATE1*, que evidencia a existência de outros genes de tolerância diferentes do *ZmMATE1* nessas linhagens. Esse resultado é altamente coerente com a porcentagem da variação fenotípica explicada pelo gene *ZmMATE1* na tolerância ao Al em populações biparentais ($r^2 \sim 0,20$, Maron et al., 2010; Guimarães et al., 2014) e confirma a existência de outros mecanismos de tolerância ao Al em milho, como demonstrado em outros trabalhos (Piñeros et al., 2005; Matonyei et al., 2020).

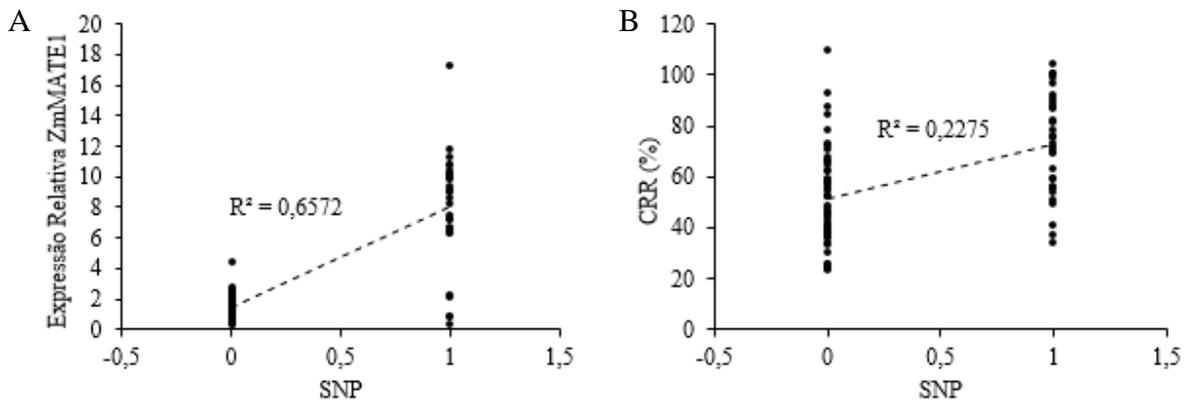


Figura 1. Correlações do SNP T/C com a expressão do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao Al avaliada com base no comprimento de raiz (CRR) em um conjunto de 80 genótipos de milho avaliados em solução nutritiva com e sem $\{39\} \mu\text{M}$ de atividade de alumínio.

A presença de três cópias do gene *ZmMATE1* (CNV) foi observada em apenas 10% dos genótipos de milho avaliados, incluindo todos os acessos da raça Cateto, uma linhagem do CIMMYT (CLA321) e duas linhagens da Embrapa (580056_8 e 5100317_5). Todas essas linhagens apresentaram alta tolerância ao Al (CRR acima de 82%), alta expressão do gene *ZmMATE1* e o alelo TT. O CNV é um polimorfismo raro em milho, conforme demonstrado por Maron et al. (2013), que está associado com a alta tolerância ao Al, conferida pela elevada expressão do gene *ZmMATE1*. Assim, o conjunto de genótipos de milho avaliado no presente trabalho possibilitou identificar novas fontes de tolerância ao Al e validar as associações dos polimorfismos no gene *ZmMATE1*, previamente identificados, com a tolerância ao Al em milho. Por outro lado, os mecanismos que controlam a tolerância ao alumínio e a expressão do gene *ZmMATE1* são complexos em milho e englobam outros fatores além do gene e dos polimorfismos avaliados no presente trabalho.

Conclusão

Novas fontes de genes e mecanismos que controlam a tolerância ao Al foram identificadas.

Os polimorfismos associados ao gene *ZmMATE1*, previamente identificados em um pequeno número de genótipos, foram validados em um conjunto de 80 genótipos de milho com ampla diversidade genética.

Outros polimorfismos, além do SNP T/C e do número de cópias, modulam a expressão do gene *ZmMATE1*, e outros mecanismos, além da alta expressão do gene *ZmMATE1*, controlam a tolerância ao Al em milho.

Referências

ACOMPANHAMENTO da Safra Brasileira [de] Grãos, v. 8, n. 12, safra 2020/202, décimo segundo levantamento. Brasília, DF: Conab, 2021.

BARROS, B. de A.; MITRE, L. K.; PINTO, M. de O.; MAGALHAES, J. V. de; GUIMARÃES, 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**, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>.

FAO. **FAOSTAT-Food and agriculture data**: production: crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 30 set. 2021.

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. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-153>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

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.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, 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 Seminário de Iniciação Científica PIBIC/CNPq, 19., 2021, Sete Lagoas**

Plant Journal, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.04103.x>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1220766110>.

MATONYEI, T. K.; BARROS, B. de A.; GUIMARÃES, R. G. N.; OUMA, E. O.; CHEPROT, R. K.; APOLINÁRIO, L. C.; LIGEYO, D. O.; COSTA, M. B. R.; WERE, B. A.; KISINYO, P. O.; ONKWARE, A. O.; NODA, R. W.; GUDU, S. O.; MAGALHÃES, J. V. de; GUIMARÃES, C. T. Aluminum tolerance mechanisms in Kenyan maize germplasm are independent from the citrate transporter ZmMATE1. **Scientific Reports**, v. 10, article 7320, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64107-z>.

PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; MANSLANK, H. S.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, v. 137, n. 1, p. 231-241, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.104.047357>.

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. DOI: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>.