Retrocruzamento Assistido por Marcadores Moleculares para Introgressão do Gene Alt_{SB} em Milho

Gabriela Chaves Pena[1]; Beatriz de Almeida Barros[2]; Andrea Almeida Carneiro[3]; Newton Portilho Carneiro[3]; Silvia Neto Jardim Belicuas[3]; Jurandir Vieira de Magalhães[3]; Ubiraci Gomes de Paula Lana[2]; Carlos Fasane da Silva Tinoco[4]; Claudia Teixeira Guimarães[3*]

[1] Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa
[2] Analista da Embrapa Milho e Sorgo
[3] Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo
[4] Estudante do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Sete Lagoas, Bolsista do Convênio GCP/Embrapa
[*] Autor correspondente

Vigência da bolsa:

28/07/2011 à 31/12/2011

RESUMO

Um dos fatores que mais prejudica a produção agrícola em solos ácidos é a toxicidade do alumínio, presente em aproximadamente 50% das terras cultiváveis do mundo, com destaque nas áreas do Cerrado. Recentemente, um gene de efeito maior, responsável pela tolerância ao Al, Alt_{SB}, foi identificado e clonado em sorgo. O Alt_{SB} é um gene que confere tolerância ao Al em sorgo por meio da exsudação de citrato induzida por Al nos ápices radiculares. Visando o aumento dos níveis de tolerância ao Al em milho, esse gene foi introduzido via transgenia em um genótipo temperado Hi II, não adaptado às condições do Brasil. Assim, o presente trabalho teve como objetivo utilizar a seleção assistida por marcadores moleculares para introgredir o transgene Alt_{SB} em uma linhagem elite tropical de milho. Três eventos transgênicos foram utilizados como doadores do gene Alt_{SB} e a linhagem elite L3 foi utilizada como genitor recorrente. Foram realizados dois ciclo de retrocruzamentos, selecionando as plantas quanto à presença do transgene por meio de marcadores específicos e para o gene de seleção bar, e quanto à recuperação do genoma recorrente com base em um total de 39 marcadores microssatélites distribuídos nos 10 cromossomos do milho. Ao final do segundo ciclo de retrocruzamento, foi possível obter plantas contendo o gene Alt_{SB} com recuperação de até 95% do genoma recorrente, superior ao esperado no RC2, que é de 87,5%. Assim, o retrocruzamento assistido por marcadores moleculares acelerou a obtenção de linhagens elites transgênicas.

Palavras-chave: Milho. Marcadores Moleculares. Gene $Alt_{SB.}$ Retrocruzamento Assistido. Tolerância ao Alumínio.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de milho ocorre, principalmente, na região do Cerrado, que possui solos originalmente ácidos, com presença de alumínio tóxico (Al^{3+}). Plantas não adaptadas que crescem em solos contendo o Al possuem o sistema radicular reduzido, dificultando a absorção de água e nutrientes do solo, reduzindo seu potencial de produção (MENDES et al., 2010).

A interferência do alumínio no desenvolvimento vegetal já vem sendo discutido há muitos anos. Em solos com pH igual ou menor a 5, o alumínio é liberado na forma Al^{3+}, que possui um efeito rizotóxico, prejudicando o crescimento e a produtividade da planta. Com isso, a identificação de genes que conferem tolerância ao alumínio pode ajudar a entender melhor os mecanismos desenvolvidos pela planta para minimizar o dano causado pelo Al. Em trabalhos realizados na Embrapa Milho e Sorgo, foi clonado um gene que confere tolerância ao Al em sorgo, o gene *Alt$_{SB}$* (MAGALHÃES et al., 2007), que induz a liberação de citrato no ápice da raiz, complexando o Al tóxico.

A transferência desse gene para plantas de milho pode ser uma alternativa promissora para aumentar a tolerância dessa gramínea ao alumínio tóxico. Nesse sentido, foram gerados eventos de milho expressando o gene *Alt$_{SB}$* por meio da transformação genética. No entanto, o híbrido temperado Hi II foi o genótipo utilizado como alvo para a transgenia, pois possui uma elevada capacidade de regeneração *in vitro* (FRAME et al., 2000), aumentando as chances de obtenção de transgênicos. Assim, para que esses eventos possam ser utilizados em condições tropicais, é necessária a introgressão deles em linhagens elites do programa de melhoramento da Embrapa. Para esse fim, o método de melhoramento mais indicado é o de retrocruzamentos, utilizando a linhagem elite como parental recorrente, processo esse que requer de seis a sete gerações para a obtenção da linhagem introgredida. Assim, o presente trabalho teve como objetivo utilizar um programa de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares para acelerar a introgressão do transgene *Alt$_{SB}$* em uma linhagem elite de milho do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Genético

Foram utilizados três eventos de milho transformados por *Agrobacterium* com o gene *Alt$_{SB}$* de sorgo: A2.17, A2.22 e A4.13, desenvolvidos por Possa et al. (2010). Esses

eventos apresentam uma única cópia do transgene, além de valores superiores de expressão do Alt_{SB} e de tolerância ao Al em relação aos genótipos não transgênicos.

Ciclos de Retrocruzamento

A introgressão do gene Alt_{SB} na linhagem L3 foi realizada por meio de dois ciclos de retrocruzamento assistido seguido de um ciclo de autofecundação para obtenção do transgene em homozigose. Como genitor recorrente, foi usada a linhagem tropical L3 da Embrapa Milho e Sorgo, e os doadores foram os eventos transgênicos (A4.13, A2.17 e A2.22).

Isolamento do DNA

Sementes de milho foram plantadas em bandejas de isopor contendo substrato e estas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada. Após duas semanas, foram coletados de 3 a 4 discos foliares de cada planta para extração do seu DNA, segundo o procedimento descrito por Lana et al. (2010).

Seleção dos Indivíduos RC1 e RC2 Contendo o Transgene

A primeira etapa da seleção nos ciclos RC1 e RC2 consistiu na genotipagem para a presença do transgene. No RC1 a seleção foi realizada com os *primers* JL57 F (GTG CTG GAT CCG ATC CTG AT) e JL58 R (CAC TGC CGA AGA AAC TTC CA), que amplificam o gene Alt_{SB} nas seguintes condições: Tampão de PCR 1X; $MgCl_2$ 2,5 mM; dNTPs 62,5 µM; 2,5 pmol de cada *primer*; DMSO 5% (v/v); 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); e 30 ng de DNA genômico. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% (m/v) por aproximadamente 1h e 30 min a 100 V; em tampão de TAE 1x (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA pH 8,0), tratado com brometo de etídio (1 µg/mL) e registrado em fotodocumentador (Kodac Gel Logic 200 Imaging System).

No RC2 foram utilizados os *primers* Bar F (AGA AAC CAC GTC ATG CC) e Bar R (TGC ACC ATC GTC AAC CAC), que amplificam o gene marcador Bar, localizado no cassete de transformação. As condições da reação da PCR foram idênticas às descritas anteriormente. No entanto, os fragmentos amplificados foram visualizados por meio da coloração do gel de agarose 1% (m/v) corados com Gel Red 0,1% (v/v) (Biotium).

Marcadores SSR para a Seleção do Genoma Recorrente

Foi realizado um *screening* com 293 *primers* distribuídos ao longo do genoma para a seleção daqueles polimórficos entre os parentais L3, A2.17, A4.13 e A2.22. Destes, foram selecionados 22 *primers* polimórficos não fluorescentes para serem

utilizados na geração RC1 e RC2 e 17 *primers* fluorescentes, para serem usados no RC2.

As reações de amplificação por PCR com os *primers* não fluorescentes foram realizadas seguindo o protocolo contendo: 30 ng de DNA genômico; tampão PCR 1X; $MgCl_2$ 2,0 mM; dNTPs 0,125mM; 1,25 pmol de cada *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação consistiu em uma desnaturação de 94 ºC por 4 minutos, seguida de 8 ciclos de amplificação de 94 ºC por 20 segundos, 68 ºC com redução de 1 ºC a cada ciclo por 20 segundos, 72 ºC por 20 segundos; e mais 25 ciclos de extensão de 94 ºC por 20 segundos, 60 ºC por 20 segundos e 72 ºC por 20 segundos; finalizando em 72 ºC por 5 minutos; e mantidos a 4 ºC.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 10% (m/v), sob eletroforese vertical por 2 h a 150 v. O gel foi tratado com solução fixadora (etanol 10% (v/v); de ácido acético 0,5% (v/v)) durante 20 minutos, seguido por solução de nitrato de prata (0,2% (m/v) por 15 minutos. Em seguida, o gel foi incubado em solução reveladora [NaOH 3% (m/v), formaldeído 0,5% (v/v)] até o aparecimento das bandas. Após a coloração, os géis foram registrados em fotodocumentador (Kodac Gel Logic 200 Imaging System).

As reações de amplificação com *primers* SSR fluorescentes foram realizadas utilizando 30 ng de DNA genômico; tampão PCR 1X; $MgCl_2$ 2,0 mM; dNTPs 0,125 mM; 1,25 pmol de cada *primer*, 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O *primer F* de cada um dos pares foi marcado com uma das três fluorescências: FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarelo). A amplificação foi realizada com uma desnaturação de 94 ºC por 4 minutos, seguida de 8 ciclos de amplificação de 94 ºC por 20 segundos, 68 ºC com redução de 1 ºC a cada ciclo por 20 segundos, 72 ºC por 20 segundos; e mais 25 ciclos de extensão de 94 ºC por 20 segundos, 60 ºC por 20 segundos e 72 ºC por 20 segundos; finalizando em 72 ºC por 5 minutos.

A seguir, foram misturados 2 µL da reação diluída 10 vezes com 1,5 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5 µL de corante (blue dextran 50 mg/mL; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95 ºC, mantidas em gelo até a aplicação em gel desnaturante de poliacrilamida 5% (m/v). Os produtos amplificados foram visualizados no sequenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), submetido a 3000V por 1,5 h em tampão de TBE (Tris-HCl 0,089 M; H_3BO_3 0,089 M ; EDTA 0,002 M, pH 8,0).

Para avaliar a recuperação do genoma recorrente distribuída ao longo dos 10 cromossomos foi utilizado o software GGT (VAN BERLOO, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Seleção para a Presença do Gene Alt_{SB} nos Ciclos de Retrocruzamento Assistido

Para a população derivada do evento A4.13, de um total de 92 plantas RC1, 56 mostraram a presença do gene Alt_{SB} com base nos *primers* JL57/58. Para o evento A2.17, de 93 plantas, 48 foram positivas para o gene. Já entre as 54 plantas do evento A2.22, 32 plantas apresentaram o gene de interesse.

A seleção para a presença do transgene no RC2 foi realizada com o *primer* específico para o gene de seleção *bar*. Foram selecionados 12, 29 e 18 indivíduos positivos nas populações derivadas dos eventos A4.13(16), A2.17 (120) e A2.22 (105), respectivamente. A Figura 1 apresenta o perfil de amplificação de indivíduos RC2 para a presença/ausência do gene bar. Os eventos apresentaram segregação esperada de 1:1 para a presença/ausência do transgene pelo teste de χ^2 a 5% de probabilidade, exceto o evento A4.13.

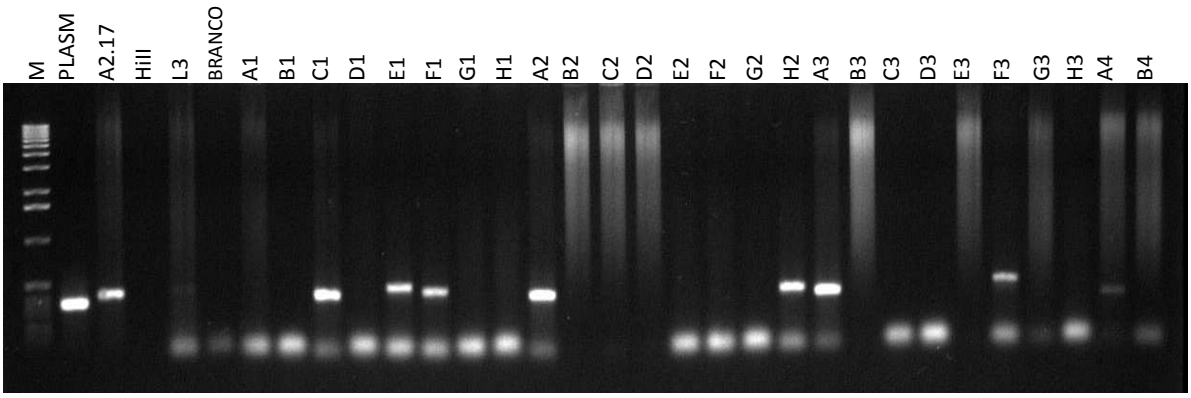

Figura 1: Segregação do gene *bar* em indivíduos RC2, provenientes do evento A2.17 (120), derivado de Hi II x L3 (parental recorrente). Na primeira canaleta (M) está o marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen), seguida pelo controle positivo com o plasmídeo (PLASM).

Tais resultados confirmam que os eventos possuem apenas uma cópia do transgene, o que é altamente desejável em termos de biossegurança. A não significância do teste de χ^2 para o evento A4.13 no segundo ciclo de retrocruzamento pode ter sido afetado pela amostragem menor comparada aos outros dois eventos. No entanto, análises adicionais serão realizadas para confirmar a presença do transgene em cópia única nesse evento.

Seleção para a Recuperação do Genoma Recorrente

Inicialmente, foi realizado um *screening* com 193 *primers* SSR marcados e não marcados com fluorescência, para a seleção daqueles polimórficos entre Hi II e L3. Um total de 22 *primers* SSR não fluorescentes, distribuídos em todos os dez cromossomos de milho foram avaliados entre os indivíduos RC1.

A genotipagem com os marcadores no RC1 possibilitou a identificação de indivíduos com recuperação entre 85 e 88% do genoma recorrente. Essa recuperação equivale à média do RC2 (87,5%), indicando o ganho em um ciclo de retrocruzamento.

Já no ciclo RC2, 17 marcadores SSR fluorescentes foram analisados, como apresentado na Figura 1. Considerando os 39 marcadores moleculares utilizados, foram selecionados oito indivíduos RC2 dos eventos A2.17 e A2.22 com recuperação média de 94 e 93,5% do genoma recorrente, respectivamente (Tabela 1). Já para o evento A4.14 foram selecionados dois indivíduos RC2 com recuperação média de 90,5% do genoma da L3. Essa diferença no número de planas recuperadas é justificada pelo menor número de indivíduos amostrados.

Tabela 1: Percentual de recuperação do genoma recorrente das plantas RC2 selecionadas

Eventos	N^{o} Planta RC2	% Recuperação Média de L3	Faixa de Recuperação do Genoma (%)
A2.17	8	94	92 - 95
A2.22	8	93,5	91 - 96
A4.13	2	90,5	89 - 92

Outra forma de visualizar o genótipo gráfico dos indivíduos RC2 está apresentada na Figura 2, onde uma pequena porção do genoma está ainda em heterozigose.

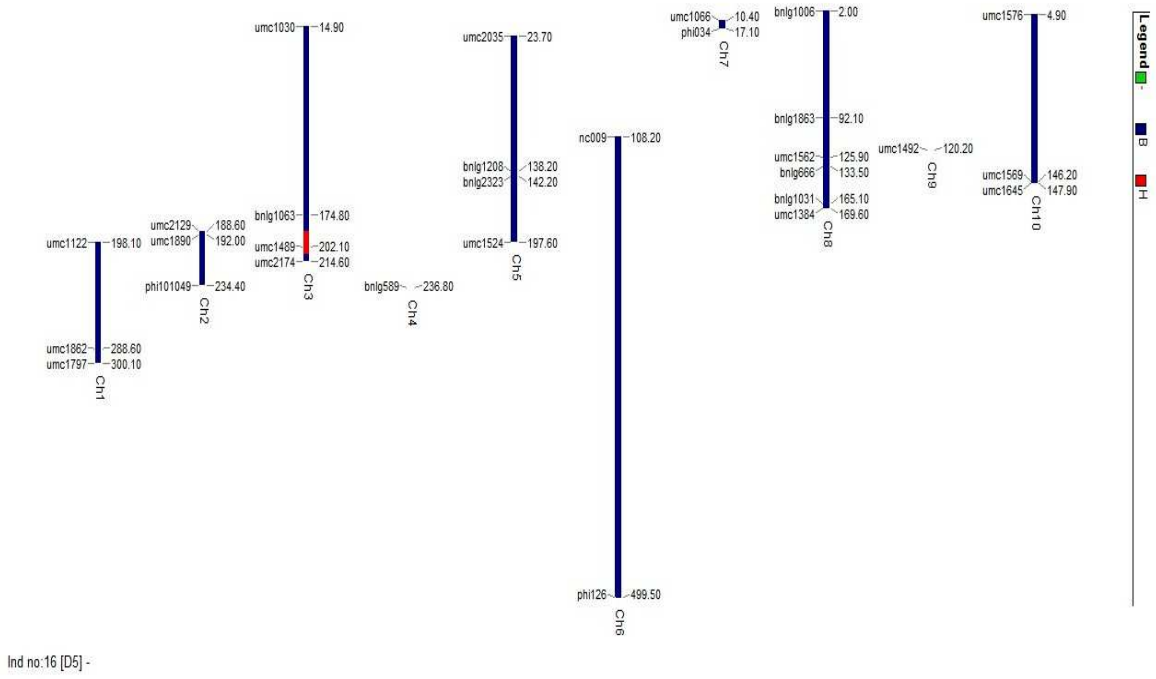

Figura 2: Genótipo gráfico de um indivíduo derivado do evento A2.22 , que apresenta 94% de recuperação do genoma recorrente. Em azul, o genoma recorrente da L3, e em vermelho, a porção do genoma ainda em heterozigose.

De acordo com a Tabela 1 e a Figura 2, pode-se observar que houve uma considerável recuperação do genoma recorrente, sendo amostrados todos os cromossomos do milho. Assim, com a utilização da seleção assistida foi possível acelerar em, aproximadamente, dois ciclos de retrocruzamento, uma vez que no ciclo RC4 seria esperada uma média de 96,875% do genoma recorrente.

Os indivíduos RC2 com maior percentual de recuperação do genoma recorrente serão autofecundados para obtenção do transgene em homozigose, sendo uma nova oportunidade para genotipar com os marcadores que ainda estavam em heterozigose. Assim, serão obtidas linhagens L3 altamente homozigotas e com o transgene Alt_{SB} com apenas dois ciclos de retrocruzamento assistido, apresentando-se como uma alternativa eficiente para acelerar a introgressão de outros alelos favoráveis em genótipos elite.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Ao final de dois ciclos de retrocruzamento assistido foi possível obter plantas apresentando o gene Alt_{SB} e recuperação do genoma de L3 de até 96%, muito superior à esperada, que seria de 87,5%. Os indivíduos com maior recuperação do genoma estão

sendo autofecundados para a obtenção de RC2F2, para avaliações futuras quanto à tolerância ao alumínio, exsudação de ácidos orgânicos e expressão do gene Alt_{SB}. Ao final dessas análises espera-se identificar plantas tolerantes ao alumínio tóxico que serão incorporadas ao programa de melhoramento de milho da Embrapa Milho e Sorgo.

REFERÊNCIAS

FRAME, B. R.; ZHANG, H.; SIDORENKO, L. V.; DIETRICH, C. R.; PEGG, S. E.; ZHEN, S.; SCHNABLE, P. S.; WANG, K.. Production of transgenic maize from bombarded type ii callus: effect of gold particle size and callus morphology on transformation efficiency. **Plant**, v. 21, p. 36-29, 2000.

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 17 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 104).

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y. H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; V KOCHIAN, L. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MENDES, F. F.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, L. J. M.; GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. A. P.; MACHADO, J. R. A.; MEIRELLES, W. F.; SILVA, A. R. Controle genético da tolerância ao alumínio em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 18., 2010, Goiânia. **Anais**...Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. p. 2803-2807.

POSSA, K. F.; CARNEIRO, N. P.; LANA, U. G. de P.; SILVA, V. L.; PEREIRA, M. de F.; CARNEIRO, M. H.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; CARNEIRO, A. A. Avaliação de eventos de milho transgênico produzidos por biobalística ou *Agrobacterium tumefaciens*. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Resumos expandidos**... Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 1 CD-ROM.

VAN BERLOO, W. GGT 2.0: versatile software for visualization and analysis of genetic data. **Journal of Heredity**, Washington, v. 99, p. 232-236, 2008.