

Identificação de Genes Homólogos ao *Pup1* e Mapeamento de QTLs Associados com Morfologia Radicular em Milho (*Zea mays*)

Gabriel Corradi Azevedo¹, Bárbara França Negri², Fabiano Melo Matos², Sylvia Morais de Sousa³, Jurandir Vieira de Magalhães³, Cláudia Teixeira Guimarães³

¹ Doutorando em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. gabrielcorradi@ufmg.br; ² Acadêmicos do Centro Universitário de Sete Lagoas e bolsistas CNPq/Pibic. babinegri@hotmail.com, fabianommatos@gmail.com; ³ Embrapa Milho e Sorgo. smsousa@cnpmc.embrapa.br; jurandir@cnpmc.embrapa.br e claudia@cnpmc.embrapa.br

RESUMO – Baixa disponibilidade de fósforo é uma das principais limitações para a produtividade de culturas agrícolas. Uma das estratégias adotadas pelas plantas submetidas à deficiência de P é a alteração da morfologia radicular. Em arroz, um QTL denominado *Pup1* foi associado à eficiência no uso de P e aumento do crescimento radicular sob deficiência desse nutriente. Assim, foram buscados “*in silico*” homólogos do *Pup1* no milho. Quatro genes candidatos foram mapeados em uma população de *Recombinant Inbred Lines*, derivada do cruzamento entre linhagens contrastantes para uso de P. Essa população foi fenotipada para diferentes características de morfologia radicular e genotipada com marcadores SNPs e SSRs. Quinze QTLs foram identificados, sendo quatro para comprimento total, diâmetro médio e volume de raízes finas e três para volume total, explicando entre 32 e 39% da variância genotípica das características. O gene predito GRMZM2G451147 foi colocalizado com QTLs controlando comprimento, volume total e volume de raízes finas. Adicionalmente, esse gene foi expresso sob baixo e alto P na linhagem L22, que contribuiu com alelos favoráveis para tais características. Esses resultados serão importantes para a elucidação de fatores genéticos relacionados com características radiculares e poderão contribuir para melhorar a eficiência na aquisição de P em milho.

Palavras-chave: Deficiência de P, Genômica comparativa, Mapeamento de QTLs.

Introdução

O milho é um dos produtos de destaque do setor agrícola nacional, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial (USDA, 2011). No entanto, a baixa disponibilidade de P ainda é um fator que limita a produção vegetal, principalmente nos solos ácidos, que representam de 30% a 60% da área agricultável no mundo (VON UEXKULL e MUTERT, 1995). Um dos mecanismos desenvolvidos pelas plantas para aumentar a eficiência na aquisição de P é a alteração na arquitetura radicular (RAMAEKERS et al., 2010; LYNCH, 2011). O desenvolvimento espacial do sistema radicular desempenha um papel importante na exploração do solo por fontes de P devido à baixa taxa de difusão do P no solo e a sua reduzida mobilidade. Assim, a proximidade entre a superfície de absorção da raiz e a fonte do nutriente é fundamental (RAMAEKERS et al., 2010; LYNCH, 2011).

A maioria dos estudos relacionados à morfologia radicular do milho tem demonstrado que essa é uma característica controlada por vários genes (HOCHHOLDINGER e

TUBEROSA, 2009; RAMAEKERS et al., 2010). Dessa forma, uma estratégia apropriada para o estudo de características complexas seria por meio do mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci*). Um QTL de efeito maior na absorção de P, denominado *Phosphorus uptake 1 (Pup1)*, foi identificado em dois estudos independentes em arroz (NI et al., 1998; WISSUWA et al., 1998). Dados fenotípicos em linhagens semi-isogênicas (NILs) demonstraram que o *Pup1* aumenta a absorção de P (WISSUWA et al., 2002) e confere vantagens na produtividade de arroz sob deficiência de P (CHIN et al., 2010). Adicionalmente, Wissuwa e Ae (2001) revelaram que o *Pup1* contribui com o aumento da taxa de crescimento radicular sob baixa disponibilidade de P, utilizando pares de linhagens semi-isogênicas.

Dessa forma, os objetivos do presente estudo envolveram a identificação de homólogos do gene *Pup1* em milho e o mapeamento de QTLs associados com características de morfologia radicular. Em combinação, tais informações poderão revelar associações entre genes candidatos, características de raiz e eficiência na aquisição de P em milho.

Material e Métodos

O material genético utilizado foi uma população composta por 145 *Recombinant Inbred Lines* (RILs) provenientes do cruzamento entre as linhagens L3 e L22 contrastantes na eficiência de aquisição de P (PARENTONI e SOUZA JÚNIOR, 2008).

A identificação de homólogos do *Pup1* em milho foi realizada com base na sequência nucleotídica e de aminoácidos do gene candidato identificado na região do *Pup1* em arroz (CHIN et al., 2011). Ferramentas de busca – BLASTn e BLASTp – foram implementadas em diferentes bases de dados contendo informações sobre o genoma completo do milho (www.maizesequence.org; www.gramene.org; www.phytozome.org). Os genes preditos no genoma do milho com maior identidade de sequência com o *Pup1* foram selecionados.

Pares de *primers* foram desenhados para os genes candidatos com o auxílio do programa *Primer Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi) visando a busca por polimorfismos entre os parentais da população segregante. Os polimorfismos detectados foram convertidos em marcadores do tipo CAPS ou baseados na presença/ausência de bandas, conforme apresentado na Tabela 1.

Os genes candidatos, assim como marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e SSR foram mapeados com o auxílio do programa MAPMAKER 3.0 (LINCOLN e DALY, 1992), considerando LOD mínimo de 3.0 e máxima frequência de recombinação (*r*) de 0.4. A função de mapeamento de Kosambi (1944) (NÃO

ENCONTRADO EM LITERATURA CITADA) foi utilizada para converter fração de recombinação em distâncias no mapa.

A população foi fenotipada em solução nutritiva contendo baixa concentração de P de acordo com a metodologia descrita por Sousa et al. (2012) (NÃO ENCONTRADO EM LITERATURA CITADA), em que foram avaliadas as seguintes características radiculares: comprimento total, diâmetro médio, volume total de raízes e volume de raízes com diâmetro de 1 a 2 mm.

O mapeamento de QTL foi realizado utilizando o mapeamento por intervalos múltiplos (MIM - KAO et al., 1999) seguindo as instruções do QTL Cartographer 2.5. O modelo de MIM foi usado para estimar a posição, os efeitos e a porcentagem da variância genotípica explicada individualmente pelos QTLs. Adicionalmente, o coeficiente de determinação total (R^2) representa a variância genotípica explicada por todos os QTLs suas interações.

O padrão de expressão do gene candidato GRMZM2G451147 foi avaliado em raízes dos parentais (L3 e L22) após o crescimento por 13 dias em solução nutritiva contendo baixo e alto P (2,5 μ M e 250 μ M). O RNA total foi extraído utilizando Trizol® (Invitrogen), em combinação com tubos *phase-lock* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Um micrograma do RNA total tratado com DNase foi usado para a síntese de cDNA, realizada com o Kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão gênica foi determinada por PCR quantitativo (qPCR) através de detecção química por SYBR Green I e sistema de detecção de sequência ABI Prism 7500 Sequence (Applied Biosystems). O gene de RNA ribossomal rDNA foi utilizado como controle constitutivo e o gene alvo utilizou os *primers* gc1_exp_Forw: GGCAATGGGCCTCGATTT e gc1_exp_Rev: CCACATTCCTCCATCCCTTAA). A expressão gênica relativa foi avaliada pelo método 2-DDCt (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). (NÃO ENCONTRADO EM LITERATURA CITADA)

Resultados e Discussão

De acordo com os valores de similaridade com o gene *Pup1* identificado na variedade de arroz Kasalath (Acesso no *GenBank* AB458844.1), cinco genes candidatos a homólogos do *Pup1* foram selecionados. Os genes candidatos foram localizados nos cromossomos 3, 4 e 8 de milho, cuja posição física está apresentada na Tabela 1.

Dos 394 marcadores genotipados na população, 274, que apresentaram segregação esperada (1:1), foram mapeados ao longo dos dez grupos cromossomos do milho, cobrindo

1785,7 cM do genoma. Dentre os cinco genes candidatos, quatro foram mapeados nas posições previstas, exceto o gene GRMZM164612, que não foi genotipado devido a sua proximidade física com o gene GRMZM2G451147 (Tabela 1).

Quinze QTLs foram associados com as características radiculares e foram localizados nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 8 e 10. Esses QTLs explicaram em conjunto 32,6, 38,0, 31,7 e 39,1% da variância genotípica para comprimento total, diâmetro médio, volume total e volume de raízes finas, respectivamente (Tabela 2). Em geral, vários dos QTLs mapeados no presente estudo são coincidentes com QTLs relacionados à morfologia radicular identificados na literatura (Tabela 2), principalmente com QTLs associados ao comprimento de raízes laterais (ZHU et al., 2005), peso seco da raiz em relação a parte aérea e eficiência na absorção de P (CHEN et al. 2008).

Os QTLs mapeados nos cromossomos 1 e 8 foram coincidentes para as características: comprimento total, volume total e volume de raízes finas (Figura 1). Tais características apresentam uma elevada correlação fenotípica (0,7 – 0,9), o que poderia justificar a detecção desses dois QTLs explicando importantes proporções da variância genotípica (7 a 12%) para os diferentes componentes da morfologia radicular (Tabela 2).

O gene candidato com mais alta identidade com o *Pup1*, GRMZM2G451147, foi co-localizado com QTLs para os diferentes componentes da morfologia radicular mapeados no cromossomo 8 (Figura 1). Adicionalmente, o referido gene candidato foi expresso em condições de baixo e alto P apenas na linhagem L22 (Figura 2), que contribuiu com alelos favoráveis para o comprimento total, volume total e volume de raízes finas (Tabela 2).

Assim, estes resultados apresentam evidências de que o gene candidato ao homólogo do *Pup1* em milho pode estar envolvido com alterações no sistema radicular sob baixas concentrações de P, que por sua vez podem contribuir para aumentar a eficiência na aquisição de P. Essas hipóteses são corroboradas com os efeitos do *Pup1* em arroz, que além de aumentar a taxa de crescimento radicular sob baixa disponibilidade P (WISSUWA e AE, 2001), contribui positivamente na absorção de P (WISSUWA et al., 2002) e na produtividade de arroz sob deficiência de P (CHIN et al., 2010). No entanto, estudos adicionais são necessários para a validação do gene GRMZM2G451147 como homólogo funcional do *Pup1* em milho.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão de bolsa ao primeiro autor. À FAPEMIG, ao CNPq, à

Embrapa, à McKnight Foundation - CCRP, ao Generation Challenge Programme (G7010.30.01) pelo apoio financeiro.

Literatura Citada

CHEN, J.; XU, L.; CAI, Y.; XU, J. QTL mapping of phosphorus efficiency and relative biologic characteristics in maize (*Zea mays* L.) at two sites. **Plant and Soil**, The Hague, v. 313, p. 251-266, 2008.

CHIN, J.; GAMUYAO, R.; HEUER, S.; LU, X.; ISMAIL, A.; HAEFELE, S.; WISSUWA, M. Development and application of gene-based markers for the major rice QTL Phosphorus uptake. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 120, p. 1073-1086, 2010.

CHIN, J. H.; GAMUYAO, R.; BUSTAMAM, M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. Developing Rice with high yield under phosphorus deficiency: *Pup1* sequence to application. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 1202-1216, 2011.

HOCHHOLDINGER, F.; TUBEROSA, R. Genetic and genomic dissection of maize root development and architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 1-6, 2009.

KAO, C.; ZENG, Z.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 152, p. 1203-1216, 1999.

LINCOLN, S.; DALY, M. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0**. Cambridge: Whitehead Institute, 1992.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 1041-1049, 2011.

NI, J. J.; WU, P.; SENADHIRA, D.; HUANG, N. Mapping QTLs for phosphorus deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 1361-1369, 1998.

PARENTONI, S. N.; SOUZA JÚNIOR, C. L. S. Phosphorus acquisition and internal utilization efficiency in tropical maize genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 893-901, 2008.

RAMAEKERS, L.; REMANS, R.; RAO, I. M.; BLAIR, M. W.; VANDERLEYDEN, J. Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 117, p. 169-176, 2010.

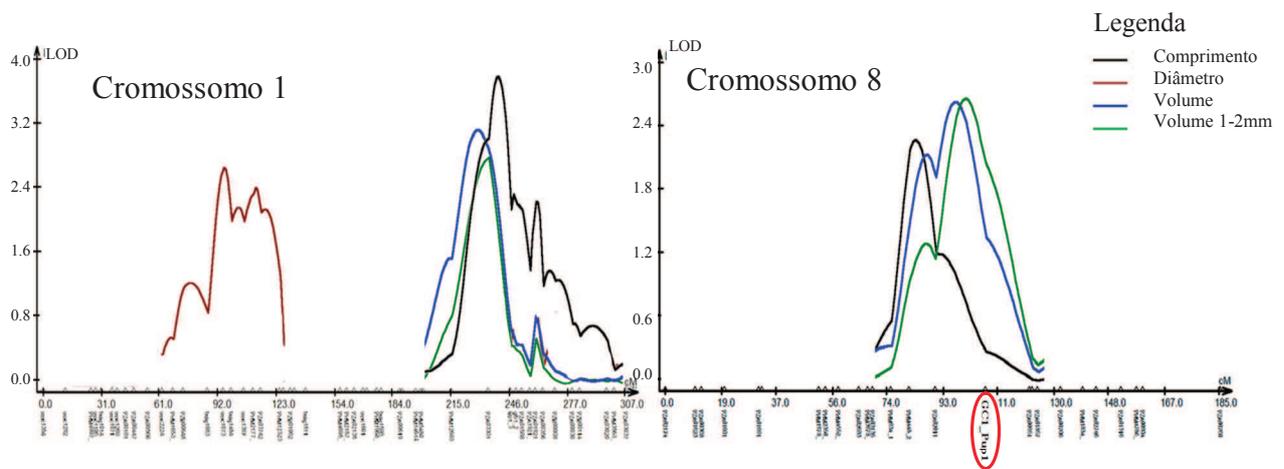
VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impacts of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, p. 1-15, 1995.

WISSUWA, M.; AE, N. Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 275-286, 2001.

WISSUWA, M.; WEGNER, J.; AE, N.; YANO, M. Substitution mapping of Pup1: a major QTL increasing phosphorus uptake of rice from a phosphorus-deficient soil. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, p. 890-897, 2002.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 97, p. 777-783, 1998.

ZHU, J.; KAEPLER, S. M.; LYNCH, J. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.111, p. 688-695, 2005.



QTLs identificados nos cromossomos 1 e 8. Para ambos os cromossomos há sobreposição entre QTLs controlando o comprimento, volume e volume de raízes finas. No cromossomo 8, o gene GRMZM2G451147 (identificado como GC1_Pup1), colocalizado com os QTLs, está destacado.

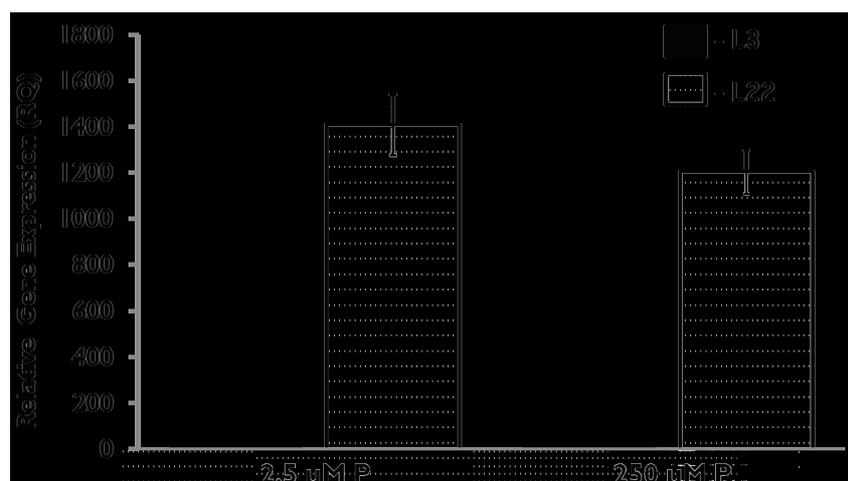


Figura 2. Expressão do gene candidato GRMZM2G451147 nas raízes crescidas sob baixo (2,5 μ M) e alto (250 μ M) P.

Tabela 1. Genes candidatos a homólogos funcionais do *Pup1* em milho.

Identificação do gene	Posição física	Identidade % (Máxima ident.)	E-value	Genotipagem ¹
GRMZM2G451147	Chr8: 152,043,859	71.4 (94)	9e – 131	Presença/Ausência de amplicons
GRMZM2G164612	Chr8: 152,100,275	71.2 (94)	2e – 127	-----
AC193632.2_FGP002	Chr4: 39,792,602	69 (100)	1e – 105	CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence)
GRMZM2G448672	Chr3: 206,918,421	66 (68)	3e – 186	Presença/Ausência de amplicons
GRMZM2G412760	Chr3: 20,172,140	65 (65)	1e – 40	CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence)

1. Forma de genotipagem do gene candidato nos parentais e, posteriormente, na população de RILs.

Tabela 2. Lista de QTLs detectados para comprimento total radicular, diâmetro médio, volume médio e volume de raízes finas (1 – 2 mm).

Caract. ¹	Crom	Marcador flanqueando	LOD	Effect ²	r ² (%)	QTL literatura ³
C	1	PHM12693 / Kip1_3	3.88	-16.7098	12.9	CRL, PSR/PA
C	5	PZA01530 / PHM2769	3.39	14.5995	7.2	-----
C	8	PHM934 / PZA02011	2.26	-12.0662	7.6	CRL
C	10	umc2043 / PHM18513	2.04	-9.9299	4.9	-----
D	1	bnlg1083 / bnlg1484	2.87	0.0194	7	-----
D	4	PZB00093 / PZA03116	2.75	0.0295	16.9	-----
D	6	PHM5794 / PHM16607	1.29	0.0135	4.4	CRL, EAP, PSR/PA
D	7	PZA02018 / PZA03166	3.49	-0.0221	9.7	-----
V	1	PZA01963 / PZA03301	3.13	-0.0741	11.6	CRL, PSR/PA
V	8	PHM448_2 / GC1_Pup1	2.6	-0.0711	12.1	CRL
V	10	PZA00463 / PHM1155	2.72	-0.0577	8	-----
V2	1	PHM12693 / Kip1_3	2.68	-0.0344	5	CRL, PSR/PA
V2	6	lac1_3 / PZA01884	1.99	0.0307	4.4	-----
V2	8	PHM448_2 / GC1_Pup1	2.65	-0.0425	12.1	CRL
V2	10	PHM1812 / PZA02941	6.63	-0.0548	17.6	-----

¹ - Características avaliadas: C – Comprimento total; D – Diâmetro médio; V – Volume total; V2 – Volume raízes finas (1 – 2 mm). ² - Valores positivos indicam que o alelo é oriundo de L3 e valores negativos indicam que o alelo é oriundo de L22. ³ CRL – comprimento de raiz lateral; PSR/PA – peso seco da raiz em relação à parte aérea; EAP – eficiência na absorção de P.