

Sete Lagoas, MG
Setembro, 2010

Autores

Carlos Fasane da Silva Tinoco
Estudante de Graduação
em Ciências Biológicas –
UNIFEMM, Bolsista da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,
MG, carlosfasane@yahoo.
com.br

Jurandir Vieira Magalhães,
Engenheiro-Agrônomo, Ph.D.,
Pesquisador da Embrapa Milho
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,
jurandir@cnpms.embrapa.br

Sílvia Neto Jardim Belicuas
Bióloga, D.S., Pesquisadora da
Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, silvia@cnpms.
embrapa.br

Lauro José Moreira Guimarães
Engenheiro-Agrônomo, Ph.D.,
Pesquisador da Embrapa Milho
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,
lauro@cnpms.embrapa.br

Sidney Netto Parentoni
Engenheiro Agrônomo, D.S.,
Pesquisador da Embrapa Milho
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,
sidney@cnpms.embrapa.br

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Químico, M.S., Analista da
Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, ubiraci@cnpms.
embrapa.br

Claudia Teixeira Guimarães,
Engenheira-Agrônoma, D.S.,
Pesquisadora da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,
MG, claudia@cnpms.embrapa.
br – Autor Correspondente.

Obtenção de Linhagens Isôgenicas para QTLs de Tolerância ao Alumínio em Milho Utilizando Retrocruzamento Assistido por Marcadores Moleculares

Tolerância ao Alumínio em Milho

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social, sendo cultivado em praticamente todas as regiões agrícolas do mundo para a alimentação humana, animal e, mais recentemente, como fonte de biocombustível. No Brasil, a produção desta cultura vem experimentando aumentos expressivos nos últimos anos, resultando em um impacto significativo na sustentabilidade nacional. Atualmente, o país é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo superado pelos Estados Unidos e pela China (FAO, 2009).

Apesar do alto patamar de produção, a produtividade média brasileira, ainda é considerada baixa se comparada à de outros países produtores. Dentre os fatores que contribuem para a baixa produção de grãos, destaca-se a toxidez causada pelo alumínio (Al), intrínseca aos solos ácidos predominantes nas regiões agrícolas tropicais (FAO, 2009). Estes solos compreendem aproximadamente 48% da área agricultável em todo mundo (JEXKULL; MUTERT, 1995) e mais de 200 milhões de hectares de áreas agricultáveis no Brasil, equivalendo à região do Cerrado. Em condições de elevada acidez ($\text{pH} \leq 5,0$), o Al agregado ao solo libera formas iônicas (Al^{3+}), passando a ser solúvel e extremamente tóxico às plantas (KOCHIAN; JONES, 1997). Este Al provoca uma rápida inibição do crescimento radicular, acarretando uma menor exploração do solo e uma consequente maior susceptibilidade à seca e às deficiências minerais (KOCHIAN, 1995).

Genótipos tolerantes ao Al têm sido identificados em diferentes espécies vegetais, porém os mecanismos fisiológicos e os fatores genéticos responsáveis pela tolerância ao Al precisam ser melhor compreendidos. 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), e por isso denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*). Corroborando com tais resultados, Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco QTLs de tolerância ao Al, sendo que apenas o QTL localizado no cromossomo 6 (bin 6.00) foi coincidente com os estudos de Sibov et al. (1999). Recentemente, Maron et al. (2010) identificaram dois genes candidatos, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, que colocalizaram com dois QTLs de maior efeito na população de RILs (*Recombinant Inbred Lines* ou Linhagens Recombinantes Endogâmicas) derivada do cruzamento entre Cateto AI237 e L53.

Uma das estratégias para a validação de genes candidatos é por meio de estudos genético-moleculares e fisiológicos avançados, que necessitam fundamentalmente de estoques genéticos apropriados. Para esse fim, o desenvolvimento de linhagens isogênicas é de grande importância, uma vez que apresentam *background* genético homogêneo, variando apenas na região do gene ou do QTL de interesse.

Vantagens do Retrocruzamento Assistido

O método do retrocruzamento é o mais indicado quando se tem por objetivo a introgressão de um ou poucos genes, com a subsequente recuperação do genoma recorrente, o que seria plenamente adequado para o desenvolvimento de linhagens isogênicas, além das várias aplicações ao melhoramento genético vegetal. Esse método consiste no cruzamento sucessivo de uma geração F_1 com um de seus genitores, denominado de recorrente. No entanto, o tempo necessário para a recuperação do genoma recorrente é uma limitação desse método, que pode ser de 3 a 5 anos, dependendo da divergência genética entre o parental doador e o recorrente. Considerando que o genitor doador normalmente não é adaptado às condições de cultivo e que o objetivo final é recuperar o genoma de genótipos-elite, devem ser realizados pelo menos quatro ciclos de retrocruzamento.

Para acelerar o processo de retrocruzamento, a seleção assistida por marcadores moleculares é uma estratégia que tem sido amplamente utilizada, consistindo no uso de marcadores tanto para acompanhar a introgressão do loco de interesse quanto para avaliar a recuperação do genoma recorrente. No primeiro caso, é importante a existência de marcadores ligados ao loco ou QTL de interesse. Já o monitoramento do genoma recorrente requer um número maior de marcadores aleatórios no genoma, reduzindo o número de ciclos para a recuperação adequada do parental recorrente. Vários critérios em termos de números de marcadores e de indivíduos têm sido propostos para a amostragem do genoma em programas de retrocruzamento assistido (OPENSHAW et al., 1994; FRISCH et al., 1999; MORRIS et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2009). No entanto, o importante é que a utilização desses marcadores seja otimizada em função dos custos e da sua operacionalização para as condições de rotina do laboratório.

Como é importante estabelecer uma estratégia de retrocruzamento assistido em milho, a obtenção de linhagens isogênicas para os dois QTLs de tolerância ao Al, onde foram colocalizados os genes candidatos, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, foi utilizada

como modelo. Assim, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver linhagens isogênicas (NILs – *Near Isogenic Lines*) utilizando a estratégia de retrocruzamento assistido por marcadores moleculares.

Linhagens Doadoras e Recorrentes

As linhagens Cateto AI237 e L53, classificadas previamente como tolerante e sensível ao Al tóxico, respectivamente, foram cruzadas para a obtenção da população de 118 linhagens recombinantes (RILs) que foram genotipadas com 174 marcadores SSR, RFLP e STS. Nessa população, foram mapeados dois QTLs de efeito maior para a tolerância ao alumínio, explicando em torno de 16% da variância fenotípica para a tolerância ao alumínio.

Tais QTLs foram mapeados nos cromossomos 6 e 5, onde foram colocalizados com genes candidatos *ZmMATE1* e *ZmMATE2* (MARON et al., 2010). Assim, as linhagens recombinantes RIL-84 e RIL-150 foram selecionadas como doadoras, uma vez que apresentaram cada um dos QTLs, possuíam em torno de 50% do genoma da L53 e possuíam uma tolerância intermediária ao Al tóxico. O genótipo gráfico das duas linhagens doadoras está apresentado na Figura 1, sendo a L53 (linhagem recorrente), cujo genoma está representado pela cor azul.

Esquema do Retrocruzamento Assistido

Cada uma das RILs foi cruzada com a linhagem L53 e o F_1 foi retrocruzado por duas gerações com o mesmo parental recorrente (Figura 2). A partir do RC_2 , as plantas selecionadas foram autofecundadas por dois ciclos para se obter uma quantidade razoável de sementes das linhagens isogênicas.

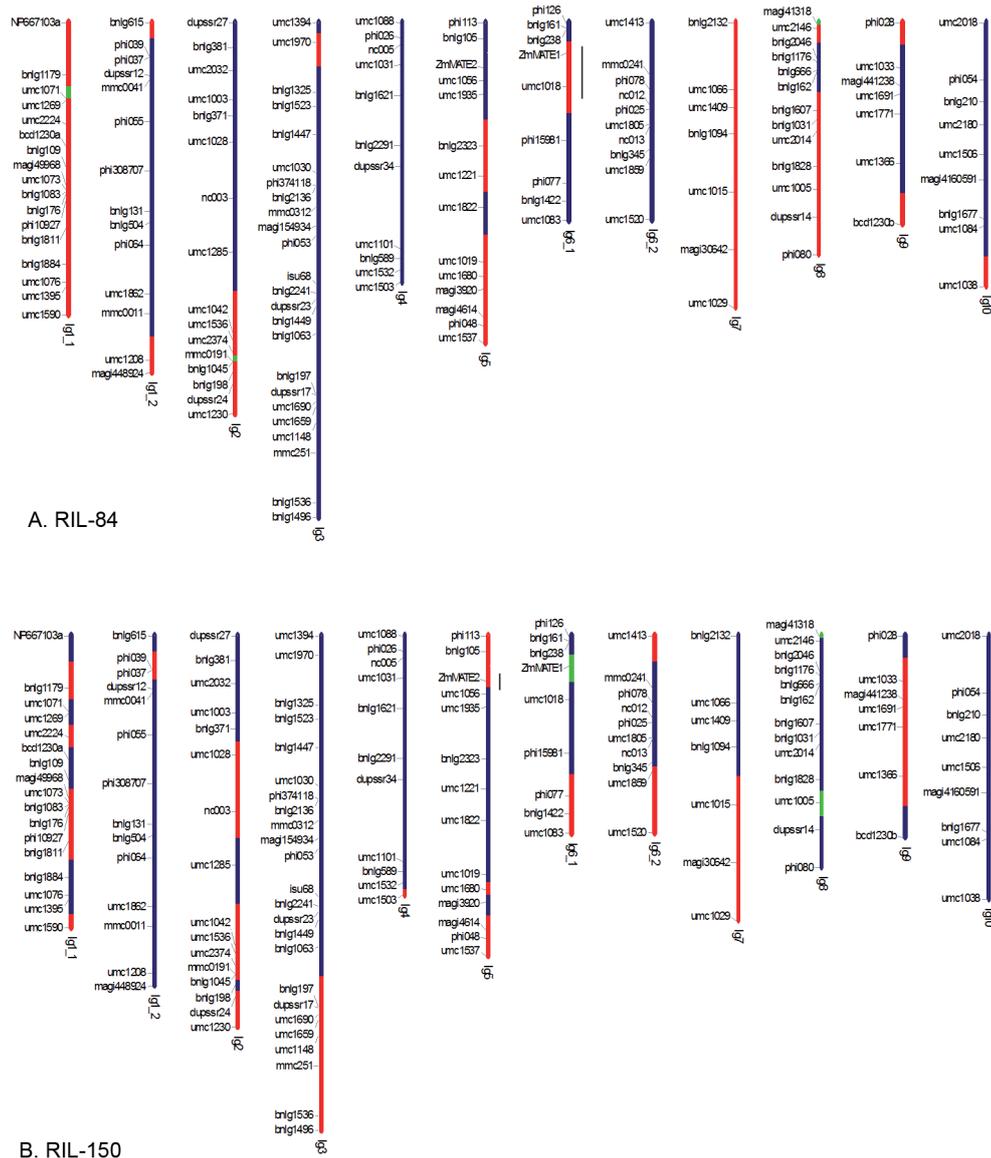


Figura 1. Genótipo gráfico das linhagens recombinantes RIL-84 e RIL-150 doadoras dos QTLs. As regiões realçadas por um traço à direita indicam os QTLs e os genes candidatos derivados do Cateto AI237, que serão alvos para a introgressão via retrocruzamento assistido. Em azul está representado o genoma recorrente da L53, em vermelho o genoma da Cateto AI237 e em verde estão os marcadores com dados perdidos.

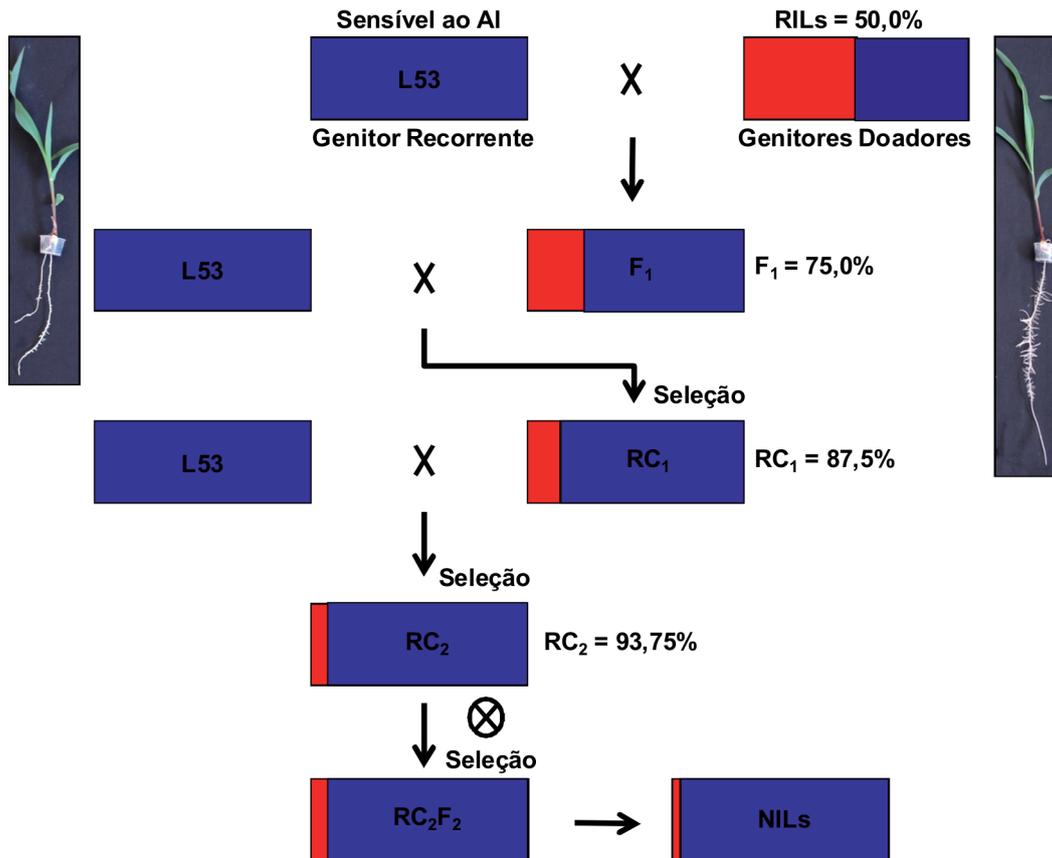


Figura 2. Ciclos de retrocruzamento utilizando as RILs como genitores doadores dos QTLs e a L53 como genitor recorrente. Os números indicam as porcentagens médias teóricas do genoma recorrente em cada geração até a obtenção das NILs (Linhagens isôgenicas). A coloração azul indica o genoma recorrente da L3 e em vermelho representa o genoma doador.

Em todos os ciclos, foram selecionados indivíduos heterozigotos para os marcadores *ZmMATE2* (cromossomo 5), *ZmMATE1* e *umc1018* (cromossomo 6). A partir do primeiro ciclo de retrocruzamento, os indivíduos selecionados foram genotipados com marcadores microssatélites distribuídos ao longo do genoma, considerando aqueles polimórficos cujas informações estavam descritas no mapa genético (Figura 1).

Genotipagem com Marcadores Moleculares

Em todo o processo de retrocruzamento assistido, o número de plantas e de marcadores moleculares utilizados em cada ciclo é o ponto mais limitante. Assim, tais condições foram otimizadas para a operacionalização da genotipagem em larga escala.

A extração do DNA genômico foi realizada no GenoGrinder 2000, seguindo o protocolo descrito por Lana et al. (2010), utilizando placas de 96 orifícios.

As reações de amplificação para os marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*) ligados aos genes candidatos *ZmMATE1* e *ZmMATE2* foram realizadas separadamente com os iniciadores descritos por Maron et al. (2010). Para o *ZmMATE1*, a amplificação foi realizada com 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 0,01% gelatina (m/v); 2,0 mM MgCl₂; 125 μM de cada um dos dNTPs; 10,0 μM de cada um dos *primers*, 5% DMSO e 1U de enzima *Taq DNA polimerase* em um volume total de 20 μL. Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos gerados foram separados em géis de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi tratado com brometo de etídio (1 μg/mL) por 15 minutos e fotografado sob luz ultravioleta no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, New York, USA) (Figura 3A).

Já para o marcador para o *ZmMATE2*, um dos *primers* foi marcado com fluorescência 6-FAM em uma reação contendo 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl (pH8,0); 50 mM KCl; 0,01% gelatina (m/v); 2,0 mM MgCl₂; 125 μM de cada um dos dNTPs; 5,0 μM de cada um dos *primers* e 1U de enzima *Taq* DNA *polimerase*, para um volume total de 20 μL. Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos foram analisados no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems®), conforme apresentado na Figura 3C.

Para os marcadores microssatélites foi utilizado o protocolo de amplificação padrão descrito por (NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003), sendo que os fragmentos amplificados foram separados em géis de poliacrilamida 10% (m/v) em tampão TBE (Tris-Base; Ácido bórico; EDTA 0,5 M pH 8.0) corados com AgNO₃ (Figura 3B). Os géis foram visualizados e fotografados sob luz branca no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, New York, USA).

Dentre os 174 marcadores utilizados na construção do mapa genético, 23 *primers* SSR foram utilizados para avaliar a recuperação do genoma recorrente nos ciclos RC₁ e RC₂, em função da existência de polimorfismos entre as linhagens doadoras e recorrente, conforme a Tabela 1. Para a linhagem isogênica derivada da RIL-84, 50 indivíduos RC₁ foram genotipados com 12 marcadores SSR, com uma média de recuperação de 74,75%, o que está muito próximo da proporção esperada de 75%. No entanto, o indivíduo selecionado apresentou 87,5% do genoma recorrente, o que já seria esperado em média no RC₂, representando o ganho de um ciclo de retrocruzamento só com base na seleção assistida. Como a RIL-84 já possuía 50% do genoma da linhagem recorrente e apenas os marcadores polimórficos foram utilizados no RC₁, a proporção de recuperação teórica apresentada na Figura 1 ainda deverá ser maior ao final do RC₂. Assim, seria esperado que as linhagens isogênicas apresentassem pelo menos 96,875% do genoma recorrente, que equivale ao quarto ciclo de retrocruzamento.

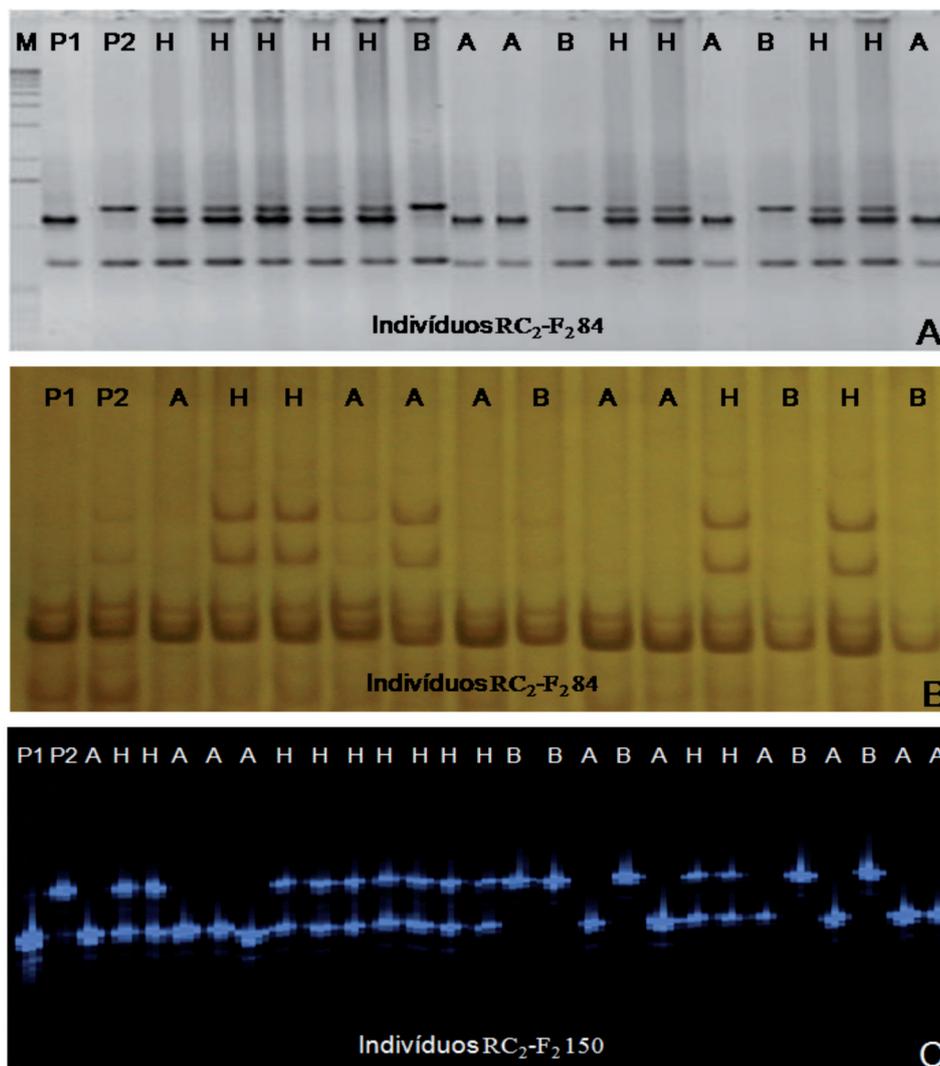


Figura 3. A - Padrão de amplificação do gene candidato *ZmMATE1* analisado em gel de agarose 1,5%. B - Padrão de amplificação do marcador umc1018 visualizado em gel de poliacrilamida 10%. C - Padrão de amplificação do gene candidato *ZmMATE2* marcado com a fluorescência 6-FAM e avaliado no sequenciador automático ABI Prism 377 (C). P1 - Linhagem doadora (Cateto AI237), P2 - Linhagem recorrente (L53), A - Alelo derivado da linhagem doadora, B - Alelo da linhagem recorrente e H - Heterozigoto.

Tabela 1. Lista de *primers* SSR utilizados na recuperação do genoma recorrente nos ciclos de retrocruzamentos, com as posições em Bin.

<i>Primers</i>	Bin
bnlg1179	1,01
bnlg176	1,03
umc1590	1,06
umc2032	2,04
nc003	2,06
umc1536	2,07
umc2374	2,07-2,08
umc1230	2,09
umc1970	3,01
umc197	3,06
bnlg1536	3,09
bnlg105	5,02
phi113	5,03-5,04
umc1680	5,06
bnlg161	6,00
bnlg1422	6,01
umc1066	7,01
umc1029	7,04
umc2146	8,03
bnlg1607	8,06
bnlg1828	8,07
umc1691	9,03
umc1208	-

Aplicações e Perspectivas

O retrocruzamento assistido já é uma realidade e tem sido implementado com sucesso no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo. No entanto, é necessário um constante aprimoramento das técnicas e pessoal treinado para aumentar a eficiência e a automatização do processo, reduzindo os custos e o tempo para a obtenção e processamento dos resultados.

O uso de marcadores acelerou o processo de obtenção das linhagens isogênicas para dois QTLs de efeito maior associados com a tolerância ao Al em milho, que serão fundamentais para a validação dos efeitos dos QTLs e para estudos moleculares avançados.

Referências

FAO. **Statistical database**. Rome, 2009. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e04.htm>>. Acesso em: 17 nov. 2010.

FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 967-975, 1999.

GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. cap. 4, p. 129-176.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; JONES, D. L. Aluminum toxicity and resistance in plants. In: YOKEL, R. A.; GOLUB, M. S. (Ed.). **Research issues in Al toxicity**. Washington: Taylor & Francis, 1997. p. 69-89.

LANA, U. G. P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. S.; SILVA, B. C. F.; 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. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos). No prelo.

LIMA, M.; MIRANDA FILHO, J. B.; FURLANI, P. R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 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 Publishers, 1987. p. 201-212.

MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; 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. **Plant Journal**, v. 61, p. 728-740, 2010.

MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J. M.; KHAIRALLAH, M. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, p. 235-247, 2003.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 223-232, 2003.

OPENSHAW, S. J.; JARBOE, S. G.; BEAVIS, W. D. Marker-assisted selection in backcross breeding. In: ASHS/CSSA JOINT PLANT BREEDING SYMPOSIUM, 2., 1994, Corvallis **Proceedings...** Corvallis: Oregon State University, 1994.

SIBOV, S. T.; GASPAR, M.; SILVA, M. J.; OTTOBONI, L. M. M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A. P. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analysis. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 475-482, 1999.

UEXKULL, H. R. von; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMET, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH: principles and management**. Dordrecht: kluwer Academic, 1995. p. 5-19.

Circular Técnica, 145

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2010): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Supervisão editorial: Adriana Noce.
Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.