

## Marcador Alelo-Específico Associado com Níveis de Expressão do Gene *ZmMATE1* em Milho

**Beatriz de Almeida Barros<sup>(1)</sup>; Letícia Kuster Mitre<sup>(2)</sup>; Marcos de Oliveira Pinto<sup>(1)</sup>; Jurandir Vieira de Magalhães<sup>(3)</sup>; Lauro José Moreira Guimarães<sup>(3)</sup>; Claudia Teixeira Guimarães<sup>(3)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Analista de pesquisa e desenvolvimento, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; beatriz.barros@embrapa.br; <sup>(2)</sup> Estudante de doutorado; Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; <sup>(3)</sup> Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

**RESUMO:** O milho é o cereal mais produzido no mundo, mas a toxicidade causada por alumínio (Al) é um estresse altamente limitante para a produção agrícola em solos ácidos. Um QTL explicando 30% da tolerância ao Al em milho foi co-localizado com o gene *ZmMATE1*. A ocorrência de três cópias do *ZmMATE1* na linhagem Cateto Al237 foi associada com altos níveis de expressão desse gene e com o aumento da tolerância ao Al. Marcadores moleculares são essenciais para a introgressão assistida de alelos superiores em linhagens elite. Neste trabalho, um SNP na região do promotor foi associado com diferentes níveis de expressão do gene *ZmMATE1* e convertido em um ensaio KASP (Kompetitive Allele-Specific PCR). O alelo T foi identificado em genótipos com alta expressão do *ZmMATE1* e o alelo C, presente naqueles com baixa expressão. Embora não se possa inferir sobre os mecanismos moleculares associados com a expressão diferencial do gene, este marcador será importante na introgressão assistida do *ZmMATE1* em milho.

promovendo a inibição do crescimento radicular (Kochian et al., 2015) e limitando o acesso a nutrientes do solo (Wang et al., 2006). Em milho, um QTL de efeito maior (*qALT6*) para tolerância ao Al foi mapeado no cromossomo 6 e co-localizado com o gene *ZmMATE1* (Maron et al., 2010). Esse gene é um homólogo do gene *SbMATE* que controla a tolerância ao Al em sorgo (Magalhaes et al., 2007). A ocorrência de três cópias de *ZmMATE1* foi associada com maior expressão gênica e tolerância ao Al na linhagem Cateto Al237 (Maron et al., 2013). No entanto, a linhagem L228-3 que apresenta moderada tolerância ao AL, possui apenas uma cópia do gene e altos níveis de expressão de *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014). O desenvolvimento de marcadores é de extrema importância para a introgressão assistida de alelos superiores em linhagens elite. Neste trabalho, foi desenvolvido um marcador molecular do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) associado com diferentes níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

**Termos de indexação:** SNP (*single nucleotide polymorphism*; Polimorfismo de nucleotídeo único), seleção assistida, tolerância ao Al, solos ácidos.

### INTRODUÇÃO

O milho é o cereal mais produzido no mundo contribuindo significativamente para alimentação animal e como base alimentar humana em vários países (Awika, 2011). A toxicidade causada por alumínio (Al) é o maior fator limitante para a produção agrícola em solos ácidos que representam cerca de 50% das terras potencialmente agricultáveis no mundo (von Uexküll & Mutert, 1995). Em solos ácidos, o Al está presente na forma de cátion trivalente (Al<sup>3+</sup>) que é altamente tóxica,

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Material genético

Foram utilizados 28 genótipos de milho sendo: 11 linhagens da Embrapa Milho e Sorgo [Cateto Al237, L53, L228-3, (106x228-3)-158-1-1-1, (228-3x45611)x228-3, 521236, L202841-1-1-2, L262841-1-8-1, L262841-1-4-1, L2841 e L3] previamente caracterizadas para número de cópias e nível de expressão do gene *ZmMATE1* (Guimaraes et al., 2014); dois híbridos derivados de L228-3; um híbrido derivado de 521236; cinco linhagens do Quênia (K4, CON-5, 203B, 203B-14, SCH3), algumas delas avaliadas por Matonyei et al. (2014) e oito linhagens derivadas de cruzamentos entre linhagens do Brasil e do Quênia (SynAlxA089xA089-40, SynAlxR12C10-9, SynAlxR12C10-10, R11C10xSynAlxR11C10-8,

R12C10xSynAlxR12C10, R12C10xSynAlxR12C10-5, ATPS4SynAlxR12C10-5, Cateto AI 237/167-L3-5).

Para a validação do marcador, além desses genótipos foram utilizadas três linhagens isogênicas (NILs), NIL05, NIL13 e NIL19) introgridas com o *qALT6* e, consequentemente o, *ZmMATE1*, tendo a L53 como linhagem recorrente e três indivíduos heterozigotos em RC3 derivados da introgressão do *qALT6* em L3.

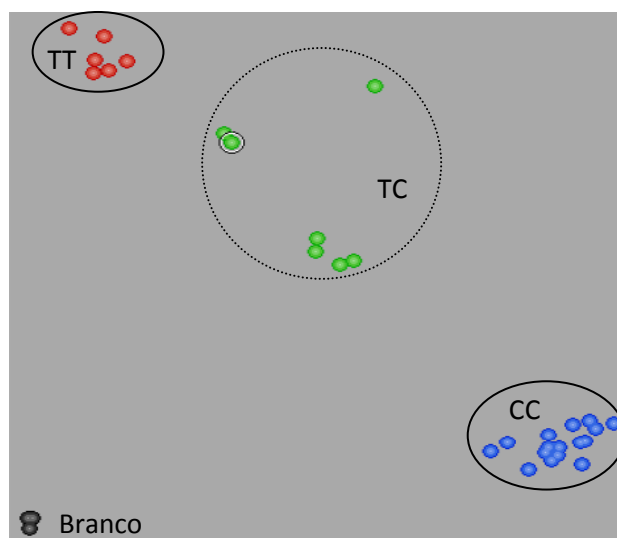
#### Identificação de um SNP na região promotora do *ZmMATE1* e desenvolvimento do marcador baseado na metodologia KASP

Sequências de 8 kb *upstream* ao ATG do gene *ZmMATE1* de duas linhagens contrastantes para tolerância a AI (Cateto AI237, tolerante e L53, sensível) foram alinhadas (Maron et al., 2013) e oito SNPs foram identificados. Conjuntos de primers flanquendo esses SNPs foram desenhados e os amplicons foram sequenciados nos 28 genótipos de milho do Brasil e do Quênia, previamente caracterizados quanto à expressão e ao número de cópias do gene *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014). A sequência de 524 pb flanqueando o SNP alvo foi enviada para o desenvolvimento do ensaio de genotipagem na LGC Genomics (www.lgcgenomics.com). O ensaio foi validado nos mesmos 28 genótipos utilizando as condições de reação recomendadas pela LGC e 27 ciclos adicionais: 94°C por 20 s e 57°C por 60 s. A intensidade da fluorescência das amostras foi quantificada por meio do leitor de microplacas FLUOstar Omega Filter-based multi-mode microplate reader (BMG Labtech) utilizando ROX na normalização do sinal. A genotipagem foi realizada utilizando o software KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos oito SNPs identificados entre Cateto AI237 e L53, somente um (C/T) foi coincidente com os níveis de expressão do gene *ZmMATE1* previamente caracterizados. O marcador foi eficiente para selecionar as três classes genotípicas baseadas nesse SNP (Figura 1).

O alelo T está presente na linhagem Cateto AI237 e em três linhagens derivadas de cruzamentos entre essa e linhagens do Quênia (SynAlxA089xA089-40, SynAlxR12C10-3 e CatA237/167-L3-5). A linhagem L228-3, que apresenta alta expressão do *ZmMATE1* e apenas uma cópia do gene (Guimarães et al., 2014), também apresenta o alelo T, bem como suas progênies. Todas as outras linhagens do Brasil e do Quênia que apresentam o alelo C, possuíam também uma cópia e baixa expressão do *ZmMATE1* (Guimarães et al., 2014; Matonyei et al., 2014).



**Figura 1.** Genotipagem com o marcador associado com o gene *ZmMATE1*, evidenciando a eficiência do ensaio para a distinção das três classes genotípicas (TT, TC e CC).

Assim, a presença do alelo T em homozigose (TT) pode ser associada com altos níveis de expressão do *ZmMATE1* (Tabela 1). Importante ressaltar que as três NILs (NIL05, NIL13 e NIL19) oriundas da L53 introgrida com o *qALT6*, que possuíam alta expressão do *ZmMATE1*, foram confirmadas em homozigose (TT)

**Tabela 1.** Linhagens de milho do Brasil e do Quênia genotipadas para o marcador associado ao gene *ZmMATE1*, número de cópias (NC) e níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

| Genótipo                | Classe genotípica | NC* | Expressão <i>ZmMATE</i> |
|-------------------------|-------------------|-----|-------------------------|
| Cateto Al 237           | TT                | 3   | Alta                    |
| L228-3                  | TT                | 1   | Alta                    |
| (106x228-3)-158-1-1-1   | TT                | 1   | Alta                    |
| (228-3x45611)x228-3)1-1 | TT                | 1   | Alta                    |
| 521236                  | TT                | 1   | Alta                    |
| L3                      | CC                | 1   | Baixa                   |
| L53                     | CC                | 1   | Baixa                   |
| 2841                    | CC                | 1   | Baixa                   |
| 262841-1-4-1            | CC                | 1   | Baixa                   |
| 262841-1-8-1            | CC                | 1   | Baixa                   |
| 202841-1-1-2            | CC                | 1   | Alta                    |
| 203B                    | CC                | -   | Baixa                   |
| 203B-14                 | CC                | -   | Baixa                   |
| CON5                    | CC                | -   | Baixa                   |
| SynAlxA089xA089-2       | CC                | -   | Baixa                   |
| SCH3                    | CC                | -   | Baixa                   |
| K4                      | CC                | -   | Baixa                   |
| SynAlxA089xA089-40      | TT                | -   | Alta                    |
| SynAlxR12C10-9          | TT                | -   | Alta                    |
| SynAlxR12C10-10         | CC                | -   | Baixa                   |
| R11C10xSynAlxR11C10-8   | CC                | -   | Baixa                   |
| R12C10xSynAlxR12C10     | CC                | -   | Baixa                   |
| R12C10xSynAlxR12C10-5   | CC                | -   | Baixa                   |
| ATPS4SynAlxR12C10-5     | CC                | -   | Baixa                   |
| Cateto Al 237/167-L3-5  | TT                | -   | Alta                    |
| NIL05                   | TT                | 3   | Alta                    |
| NIL13                   | TT                | 3   | Alta                    |
| NIL19                   | TT                | 3   | Alta                    |

\* Kenyan maize lines were not characterized for copy-number variation

## CONCLUSÕES

Foi possível identificar um SNP e desenvolver um marcador baseado na metodologia KASP associado aos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*.

Embora não se possa inferir sobre os mecanismos moleculares associados com a expressão do gene, este polimorfismo é muito útil na identificação e introgressão do alelo superior do gene *ZmMATE1* em linhagens elites de milho.

Como o SNP alvo ocorre na região promotora do gene, estudos funcionais estão sendo realizados para verificar se esse SNP é responsável pela variação dos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*,

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa, CNPq,

Fapemig e ao Generation Challenge Program (GCP) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

AWIKA, J. M. Major cereal grains production and use around the world. In: AWIKA, J. M.; PIIRONEN, V.; BEAN, S. (Ed.). **Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion**. Washington: American Chemical Society, 2011. pp 1-13.

GUIMARÃES, C. T.; SIMÕES, C. C.; PASTINA, M. M.; MARON, L. G.; MAGALHAES, J. V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; et al. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 153, 2014.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J. Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 571-598, 2015.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; YI-HONG, W.; et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. M.; GUIMARÃES, C. T.; KIRST, M.; ALBERT, P. S.; BIRCHLER, J. A.; BRADBURY, P. J. et al. Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5241-5246, 2013.

MATONYEI, T. K.; CHEPROT, R. K.; LIU, J.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; GUDU, S.; et al. Physiological and molecular analysis of aluminum tolerance in selected Kenyan maize lines. **Plant Soil**, v. 377, p. 357-367, 2014.

Von UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, v. 71, n. 1, p.1-15, 1995.

WANG, J. P.; RAMAN, H.; ZHANG, G. P.; MENDHAM, N.; Zhou, M. X. Aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.): physiological mechanisms, genetics and screening methods. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 10, p. 769-787, 2006.

