

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização de novos genes candidatos associados com tolerância ao alumínio em milho e validação de um QTL de efeito maior para tolerância ao alumínio no aumento de produtividade de grãos

ORIENTADO: Renato Coelho de Castro Vasconcellos
ORIENTADOR: Dra. Claudia Teixeira Guimarães

BELO HORIZONTE
Setembro – 2012

Renato Coelho de Castro Vasconcellos

Caracterização de novos genes candidatos associados com tolerância ao alumínio em milho e validação de um QTL de efeito maior para tolerância ao alumínio no aumento de produtividade de grãos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Claudia Teixeira Guimarães

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
2012

Agradecimentos

À minha família: Solange, Gustavo Marcelo e Camila.

À Camila, pelo seu amor, carinho, atenção, compreensão e ajuda.

À Dra. Claudia Guimarães pela confiança em mim depositada, pelo apoio, orientação e ensinamentos.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao departamento de genética pela oportunidade.

Aos amigos Carlos, Gabriel, Karla, Janaína, Bárbara, Belkiss e Christiano pela ajuda e prazerosa companhia.

Aos amigos do NBA e EMBRAPA: Ubiraci, Beatriz, Marcos e Fábio pelos valiosos ensinamentos.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para esta importante etapa na minha vida.

Aos órgãos financiadores: CAPES e Embrapa.

Sumário

Lista de Figuras	V
Lista de Tabelas	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução Geral	3
1.1. A cultura do milho	3
1.2. Solos ácidos e toxidez do alumínio	3
1.3. Mecanismos fisiológicos da tolerância ao alumínio	4
1.4. Genes de tolerância ao alumínio em plantas	5
1.5. Genética da tolerância ao alumínio em milho	6
2. Referências Bibliográficas	7
Capítulo 1	12
Caracterização de genes candidatos associados com a tolerância ao alumínio em milho ..	12
1. Introdução	12
2. Material e Métodos	13
2.1. Busca por Genes Candidatos	13
2.2. População de mapeamento	14
2.3. Mapeamento dos genes candidatos	14
2.4. Análise de expressão <i>ZmNrat1</i>	15
3. Resultados e Discussão	16
3.1. Candidatos similares ao gene <i>STOP1</i>	16
3.2. Candidatos similares ao gene <i>SbMATE</i>	20
3.3. Candidatos similares ao gene <i>Nrat1</i>	23
3.4. Análise da expressão do <i>ZmNrat1</i>	25
4. Conclusão	28
5. Referências Bibliográficas	29
Capítulo 2	32
Validação do <i>qALT6</i> de tolerância ao alumínio em milho quanto à produção de grãos sob diferentes níveis de saturação de Al no solo	32
1. Introdução	32
2. Material e Métodos	33
2.1. Material Genético	33
2.2. Delineamento experimental	34

2.3. Análises estatísticas	34
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Efeito do <i>qALT6</i> nas linhagens semi-isogênicas	36
3.2. Efeito do <i>qALT6</i> em híbridos semi-isogênicos	39
4. Conclusão	41
5. Referências Bibliográficas	42
Anexos	44

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1: Árvore filogenética construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos de *STOP1*, *ART1* e dos genes candidatos preditos em milho, por meio da máxima parcimônia.

Figura 2: QTL de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 8 de milho, *qALT8* e a posição do gene candidato GRMZM2G129428, homólogo ao *STOP1* de *Arabidopsis*.

Figura 3: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 3 de milho, *qALT3-1* e *qALT3-2*, em relação à posição do gene candidato GRMZM2G129428, homólogo ao *STOP1* de *Arabidopsis*.

Figura 4: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base no alinhamento das sequências aminoacídicas das proteínas codificadas pelos genes funcionais da família MATE associados com tolerância ao Al e seus homólogos hipotéticos em milho.

Figura 5: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 5 de milho, *qALT5-1* e *qALT5-2*, e a posição genética do gene candidato GRMZM2G065154.

Figura 6: Árvore filogenética construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos do *Nrat1* e dos genes candidatos preditos em milho por meio da máxima parcimônia.

Figura 7: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 5 de milho, *qALT5-1* e *qALT5-2*, em relação à posição genética do gene candidato GRMZM2G069198.

Figura 8: Expressão do gene *ZmNrat1* nos tecidos do ápice radicular, da raiz basal (1-3 cm acima do ápice radicular) e da folha nos tempos de 0, 1 e 3 horas.

Figura 9: Expressão do gene *ZmNrat1* no ápice radicular das linhagens tolerante (Cateto Al237) e sensível (L53) na presença de {39} μM de Al, em comparação com o controle no tempo zero e na ausência de Al.

Figura 10: Expressão do gene *ZmNr1* na região mediana da raiz (1-3 cm do ápice radicular) das linhagens tolerante (Cateto AI237) e sensível (L53) na presença de {39} μM de Al, em comparação com o controle no tempo zero e na ausência de Al.

Capítulo 2

Figura 1: Produtividade de grãos das NILs introgridas com ALT6 e seus parentais avaliadas em ambientes de 0%, 20% e 40% de saturação por Al no solo. As médias seguidas pela mesma letra de padrão similar não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ($p < 0.05$).

Figura 2: Médias de produtividade de grãos das 14 híbridos avaliados em ambientes de 0% e 40% de saturação por Al no solo. As barras são referentes à diferença significativa fornecida pelo teste de t a 5% de probabilidade.

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes homólogos ao *STOP1* no genoma do milho.

Tabela 2: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes homólogos ao *SbMATE* no genoma do milho.

Tabela 3: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes homólogos ao *Nrat1* no genoma do milho.

Capítulo 2

Tabela 1: Análises de variância conjunta para as linhagens avaliadas em diferentes níveis de saturação de AI.

Tabela 2: Análises de variância conjunta para os híbridos avaliados em ambientes com 0% e 40% de saturação de AI.

Lista de Abreviaturas

°C	Grau centigrado
μM	Micromolar
μmol	Micromol
ALMT	Aluminum-activated malate transporters
<i>AltSB</i>	Loco de tolerância ao Al em sorgo
ART1	Aluminum resistance transcription factor 1
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
Mb	Mega bases - Milhões de pares de base
NILs	<i>Near Isogenic Lines</i> – linhagens semi-isogênicas
Nramp	Natural resistance-associated macrophage protein
Nrat1	Nramp aluminum transporter 1
OsFRDL4	<i>Oryza sativa</i> MATE
QTL	Quantitative trait loci – loco de característica quantitativa
SbMATE	Sorghum MATE
STAR	Sensitive to Al rhizotoxicity
STOP1	Sensitive to proton rhizotoxicity
ZmASL	<i>Zea mays AltSB</i> -like
ZmMATE	<i>Zea mays</i> MATE
ZmNrat1	<i>Zea mays Nratt1</i>

Resumo

O Al tóxico é um dos principais fatores que limita o crescimento radicular em solos ácidos, acarretando sérias limitações na produção agrícola, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. O desenvolvimento de genótipos tolerantes ao Al é uma alternativa sustentável para superar as limitações causadas pela toxidez ao Al. A tolerância ao Al em milho é uma característica complexa, envolvendo vários genes e mecanismos, que não foram completamente elucidados até o momento. O presente trabalho foi dividido em dois objetivos: a) caracterização de novos genes candidatos associados com tolerância ao Al em milho e, b) validação de um QTL de efeito maior para tolerância ao Al na produção de grãos em milho. No primeiro capítulo, foi realizada uma busca por genes preditos no genoma do milho, utilizando genes previamente envolvidos com a tolerância ao Al em outras espécies. Foram identificados genes candidatos com altos níveis de similaridade com as proteínas codificadas pelos genes *STOP1*, *SbMATE* e *Nrat1*. No entanto, esses genes candidatos não foram co-localizados nos intervalos de confiança dos QTLs de tolerância ao Al, previamente identificados. Em função do alto nível de similaridade de sequência entre o *Nrat1* de arroz e o *ZmNrat1* de milho, procedeu-se uma análise do padrão de expressão desse gene. *ZmNrat1* apresentou expressão tecido-específica em raiz, além de uma superexpressão diferencial entre 1 e 72 horas após o tratamento com alumínio nas duas regiões da raiz seminal. Tal padrão de expressão foi altamente compatível com a expressão do *Nrat1*, sugerindo uma possível relação de ortologia entre os genes. No entanto, não foi possível concluir sobre o envolvimento do *ZmNrat1* na tolerância ao Al em milho. No segundo trabalho, a introgressão do QTL de tolerância ao Al (*qALT6*) conferiu um aumento significativo na produção de grãos em linhagens semi-isogênicas de milho em solo contendo 20% e 40% de saturação de Al. Adicionalmente, houve um efeito positivo do *qALT6* em grande parte das combinações híbridas com linhagens elites do programa de melhoramento da Embrapa, quanto à produção de grãos principalmente em solo com alta saturação de Al (40%). Apesar do experimento de campo ter sido realizado em apenas um local e em um ano agrícola, esses resultados preliminares sugerem que a introgressão do *qALT6* por meio do melhoramento assistido pode resultar em um ganho significativo na estabilidade de produção em solos ácidos.

Abstract

Al toxicity is a major limiting factor for root growth in acid soils, leading to serious problems in crop production, especially in tropical and subtropical regions. The development of Al-tolerant genotypes is a sustainable alternative to overcome the constraints caused by Al toxicity. Aluminum tolerance in maize is a complex trait involving multiple genes and mechanisms that have not been fully elucidated yet. This study was divided in two objectives: a) characterization of novel candidate genes associated with Al tolerance in maize, and b) validating the effect of a major Al tolerance QTL on maize yield performance. In the first chapter, we conducted a search for predicted genes in the maize genome using genes previously involved in Al tolerance in other species. Candidate genes sharing high protein similarity levels to the STOP1, SbMATE and *Nrat1*. However, these candidate genes were not co-localized in the confidence intervals of Al tolerance QTLs previously identified. Due to the high level of sequence similarity between *Nrat1* from rice and *ZmNrat1*, the expression of this maize candidate gene was further evaluated. *ZmNrat1* showed root specific expression, and a differential overexpression of 1 to 72 hours after Al treatment in both regions of the seminal root. This expression pattern was highly compatible with the *Nrat1* expression, suggesting a putative relationship of orthology between those genes. Although, we could not conclude about the involvement of *ZmNrat1* in maize Al tolerance. In the second study, the introgression of an Al tolerance QTL (*qALT6*) improved significantly the grain yield on maize near-isogenic lines in soils with 20% and 40% of Al saturation. Additionally, *qALT6* showed a positive effect in most of the hybrid combinations with elite lines from the maize breeding program of Embrapa, regarding to grain yield mainly in soils with high Al saturation (40%). Although the field experiment was performed in only one environment, these preliminary results suggest that introgression of *qALT6* using marker-assisted selection may result in a significant improvement on maize yield stability in acidic soils.

1. Introdução Geral

1.1. A cultura do 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. Entre as safras 2010/11 e 2011/12 houve um incremento de 9,8% na área plantada e de 26,7% na produção (CONAB, 2012), resultando em um impacto significativo na sustentabilidade nacional.

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho com uma produção em 2012 de 72.731,2 toneladas deste grão, sendo superado apenas pelos Estados Unidos e pela China (CONAB, 2012). Embora a produção no Brasil seja alta, a produtividade ainda é menor que a média mundial, com apenas 4374,66 Kg/Ha, em contraste com os EUA onde a produtividade é mais que o dobro (9592,27 Kg/Ha) (FAO, 2012).

1.2. Solos ácidos e toxidez do alumínio

Solos que apresentam valores de pH menores do que 5,0 são denominados solos ácidos e ocupam aproximadamente 50% das terras potencialmente aráveis do mundo (von Uexküll & Mutert, 1995). Em solos ácidos, a toxidez ao Al é uma das maiores restrições à produção de grãos em vários países tropicais, o que representa cerca de 73% da população mundial. Grande parte do potencial agrícola brasileiro encontra-se na região dos cerrados, que ocupa cerca de 270 milhões de hectares e apresenta problemas relacionados com a baixa fertilidade natural do solo e a toxidez causada pelo Al (Bahia Filho et al., 1997).

Além da acidez natural do solo, práticas agrícolas como o uso intensivo de fertilizantes a base de amônia aceleram o processo natural de acidificação do solo (Rao et al., 1993). Em solos ácidos, o Al é solubilizado na forma de cátion trivalente (Al^{3+}), sendo altamente tóxico, mesmo em concentrações muito baixas, na ordem de micromolar (Kochian, 1995). Nessas condições, o Al^{3+} causa uma rápida inibição no crescimento das raízes, sendo o ápice radicular o sítio primário da ação tóxica desse metal (Ryan et al., 1993). Com o sistema radicular comprometido pela toxidez do Al, a planta sensível apresentará uma maior susceptibilidade ao estresse hídrico e à deficiência de nutrientes minerais, resultando na perda de produção (Pellet et al., 1995).

A agricultura em solos ácidos viabilizou-se mediante o desenvolvimento de tecnologias específicas, dentre as quais se destacam estratégias de manejo da fertilidade do solo e o melhoramento genético para desenvolvimento de cultivares tolerantes ao Al tóxico (Bahia Filho et al., 1997). Apesar de haver estratégias agronômicas capazes de minimizar os efeitos danosos do alumínio, a forma mais eficiente e economicamente viável de aumentar a produtividade agrícola nestes solos consiste na utilização de cultivares mais tolerantes (Foy, 1984). Por isso, o aumento da tolerância ao Al para as espécies agricultáveis é considerado de fundamental importância para o aumento da produtividade em solos ácidos, principalmente no caso do milho devido à existência de variabilidade genética para tal característica (Rhue et al., 1978).

1.3. Mecanismos fisiológicos da tolerância ao alumínio

Vários mecanismos estão envolvidos na tolerância ao Al em plantas que podem ser divididos basicamente entre duas classes distintas (Kochian et al., 2004). O mecanismo fisiológico melhor embasado por dados experimentais envolve a liberação de ácidos orgânicos, principalmente pelos ápices radiculares de genótipos tolerantes (Delhaize et al., 1993 a; b). Os ácidos orgânicos, principalmente citrato, malato e oxalato, formam compostos não tóxicos estáveis com o Al^{3+} presente na rizosfera e conferem aos vegetais, tolerância à toxidez causada por este metal (Ma et al., 2001).

Outro mecanismo bastante estudado é a detoxificação interna do Al, onde este elemento é transportado para folhas, onde não causa dano à planta, ou para os vacúolos das células (Kochian et al., 2004). Algumas espécies conseguem acumular altas concentrações de Al nas folhas e nas raízes sem apresentar sinais de toxidez (Ma et al., 2000), como por exemplo folhas mais velhas de *Camellia sinensis* L. que podem acumular até 30000 mg.kg^{-1} de Al por peso seco (Matsumoto et al., 1976) sem que haja uma influência no seu crescimento. O transporte específico de Al tóxico para dentro das células foi evidenciado pela presença do gene *Nrat1* em arroz, que é responsável pelo transporte específico de Al^{3+} dentro da célula, auxiliando na tolerância ao Al (Xia et al., 2010).

1.4. Genes de tolerância ao alumínio em plantas

A genética da tolerância ao Al tem sido alvo de um número considerável de pesquisas. Em trigo (*Triticum aestivum*) foi clonado o primeiro gene de tolerância ao Al, *ALMT1*. Esse gene codifica um transportador de malato responsável pelo efluxo de malato

pelos ápices radiculares de genótipos tolerantes ao Al (Sasaki et al., 2004). O *ALMT1* é o gene correspondente ao loco de efeito maior (*Alt_{BH}*), que controla quase 85% da variação fenotípica em uma população de mapeamento (Riede e Anderson, 1996).

De forma semelhante, a tolerância ao Al em sorgo (*Sorghum bicolor*) é controlada por um único loco (*Alt_{SB}*) que explica aproximadamente 80% da variação fenotípica (Magalhães et al., 2004). Este loco corresponde ao gene de tolerância ao Al clonado nessa espécie, o *SbMATE*, que codifica um transportador de citrato localizado na membrana plasmática responsável pela exsudação deste ácido orgânico, que é ativada pelo Al, nos ápices radiculares de linhagens tolerantes (Magalhães et al., 2007). O gene *SbMATE* é membro de uma complexa família de transportadores MATE (*multi-drug and compound extrusion*) presentes em procariotos e eucariotos (Magalhães et al., 2007). Homólogos funcionais desse gene foram caracterizados em diversas plantas como cevada (Furukawa et al., 2007), *Arabidopsis* (Liu et al., 2009) e arroz (Yokosho et al., 2011).

Além dos transportadores de ácidos orgânicos, outros genes estão envolvidos no controle da tolerância ao Al em plantas. Um deles, o *STOP1*, é um fator de transcrição do tipo *zinc finger* que é induzido pela presença de H⁺ e Al³⁺, e regula a expressão de diversos genes relacionados com a tolerância ao Al em *Arabidopsis*, incluindo o *AtMATE* e o *AtALMT* (Luchi et al., 2007; Liu et al., 2009; Sawaki et al., 2009). Estes genes são possíveis ortólogos funcionais dos genes *SbMATE* de sorgo e *ALMT* de trigo, respectivamente. Em arroz um homólogo funcional do gene *STOP1* é o gene *ART1* (*Al resistance transcription factor 1*) que também é um fator de transcrição que regula a expressão de pelo menos 31 genes, entre eles os genes *STAR1* e *STAR2* (Yamaji et al., 2009). Recentemente, foi provado que o *ART1* regula a expressão do gene *OsFRDL4*, um gene da família MATE, associados com a tolerância ao Al em arroz (Yokosho et al., 2011).

Transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*) também foram associados com a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (*ALS3*, Larsen et al., 2005) e arroz (*STAR1* e *STAR2*, Huang et al., 2009). Em arroz, os genes *STAR1* e *STAR2* codificam o domínio de ligação de nucleotídeos e o domínio transmembrana, respectivamente, que, em conjunto, formam um transportador do tipo ABC, responsável pelo transporte de UDP-glicose (Huang et al., 2009). Esses autores sugerem que a UDP-glicose pode estar envolvida em modificações da parede celular, prevenindo o acúmulo do Al³⁺ e, conseqüentemente, reduzindo o dano causado por este elemento em arroz (Huang et al., 2009).

O gene *Nrat1*, membro da família *Nramp* (*natural resistance-associated macrophage protein*), codifica um transportador de Al³⁺ localizado na membrana plasmática das células radiculares de arroz (Xia et al., 2010). O *Nrat1* possui uma similaridade de sequência relativamente baixa com outros membros da família *Nramp*, que transportam tipicamente cátions divalentes, como Mn²⁺, Cd²⁺ e Fe²⁺. Assim, o *Nrat1* transporta Al³⁺ para o citosol (Xia

et al., 2010). O acúmulo de Al^{3+} poderia ser considerado prejudicial para a célula, mas os autores observaram uma redução na tolerância ao Al em mutantes deficientes no *Nrat1*. Com isso, Xia et al. (2010) sugerem que esse seria a primeira etapa de um mecanismo de detoxificação interna do Al^{3+} , que seria posteriormente armazenado no vacúolo ou em outro compartimento subcelular. Adicionalmente, Famoso et al. (2011) associaram o gene *Nrat1* com a tolerância ao Al em um painel de associação composto por 373 acessos de arroz, indicando a existência de variação natural para o gene, identificado inicialmente em mutantes.

1.5. Genética da tolerância ao alumínio em milho

Estudos genéticos sugerem que a tolerância ao Al em milho é uma característica de herança complexa (Magnavaca et al., 1987; Pandey et al., 1992), envolvendo provavelmente múltiplos genes e, conseqüentemente vários mecanismos fisiológicos (Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003; Piñeros et al., 2005). O principal mecanismo de tolerância ao Al em milho foi associado com a exsudação de citrato pela raiz (Pellet et al., 1995; Piñeros et al., 2002), apesar haver evidências de que apenas esse mecanismo não explica completamente a tolerância ao Al nessa espécie (Piñeros et al., 2005).

Em função da complexidade da característica, os primeiros estudos moleculares envolveram o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*, ou locos de herança quantitativa). Sibov et al. (1999) identificaram dois QTLs nos cromossomos 6 e 10, enquanto Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco QTLs de tolerância ao Al nos cromossomos 2, 6 e 8 de milho. Esses trabalhos foram realizados em populações de linhagens recombinantes endogâmicas (RILs) e utilizaram linhagens derivadas do Cateto como parentais tolerantes ao Al, sendo identificado uma única região genômica em comum no cromossomo 6. Posteriormente, Conceição et al. (2009) identificaram cinco marcadores SSR associados com a tolerância ao Al em cruzamentos dialélicos utilizando três linhagens sensíveis ao Al e duas tolerantes. Várias dessas regiões foram coincidentes com os QTLs de tolerância ao Al mapeados por Sibov et al. (1999) e Ninamango-Cárdenas et al. (2003).

Combinando mapeamento associativo com o mapeamento em populações biparentais, Krill et al. (2010) identificaram quatro genes candidatos associados com a tolerância ao Al em milho: *Zea mays AltSB like (ZmASL)*, *Zea mays aluminum-activated malate transporter2 (ALMT2)*, *S-adenosyl-L-homocysteinase (SAHH)*, and *Malic Enzyme (ME)*. Destes genes candidatos apenas o gene *ZmALMT2* foi caracterizado, mas sua análise funcional sugeriu que este gene não atua na tolerância ao Al em milho (Ligaba et al., 2012). Recentemente, Maron et al. (2010) clonaram e caracterizaram dois genes da família MATE

em milho, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, co-localizados com dois QTLs de efeito maior para a tolerância ao Al na espécie. Ambos os genes codificam proteínas localizadas na membrana plasmática e mediam o transporte de ânions em oócitos de *Xenopus*. No entanto, evidências experimentais indicaram que o *ZmMATE1* ativa a exsudação de citrato em ápices radiculares de *Arabidopsis* superexpressando esse gene, contribuindo para o aumento da tolerância ao Al nessas plantas. Já para o *ZmMATE2*, não foi atribuída uma função específica, podendo estar envolvido em outro mecanismo fisiológico.

Assim, evidências genéticas e fisiológicas sugerem a existência de vários genes e mecanismos de tolerância ao Al em milho, onde poucos genes candidatos foram identificados. Adicionalmente, nenhum gene associado com a tolerância ao Al em milho foi avaliado quanto ao seu efeito na produção de grãos em condições de campo. Assim, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro envolvendo a busca de novos genes associados com a tolerância ao Al e o segundo avaliando o efeito de um QTL de tolerância ao Al no aumento da produção de grãos em linhagens e híbridos semi-isogênicos de milho. Com isso, espera-se que os novos genes permitam explorar novas fontes de variabilidade genética e que elas possam ser introduzidas de forma mais eficiente em genótipos elites de milho por meio do melhoramento assistido, visando o aumento da produtividade em solos ácidos.

2. Referências Bibliográficas

Bahia Filho AFC, Magnavaca R, Schaffert RE, Alves VMC. (1997). Identification, utilization, and economic impact of maize germplasm tolerant to low levels of phosphorus and toxic levels of exchangeable aluminum in Brazilian soils. *In* Plant-Soil Interactions at Low pH: Sustainable Agriculture and Forestry Production, eds. AC Moniz et al. Brazilian Soil Science Society, Campinas/Viçosa, pp. 59-70.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf. Acesso em: 17 set. 2012.

Conceição LDHCS, Tessele C, Barbosa Neto JF. (2009). Diallel analysis and mapping of aluminum tolerance in corn inbred lines. *Maydica* 54: 55-61.

Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall PJ. (1993a). Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiology* 103:685-693.

Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. (1993b). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology* 103:695-702.

Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung C-W, Wright MH, et al. (2011) Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. *PLoS Genet* 7(8): e1002221. doi:10.1371/journal.pgen.1002221.

FAO. Statistical database. Rome, (2010). Disponível em <http://www.fao.org/docrep/011/ai482e/ai482e04.htm>. Acesso em: 17 fev. 2012.

Foy, C.D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. (Ed.) *Soil acidity and liming*. 2. ed. Madison: Soil Science Society American, p. 57-97.

Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y et al. (2007). Na aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology* 48: 1081-1091.

Huang C-F, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, et al. (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell* 21: 655-667.

Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, et al. (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Sci U S A* 104: 9900-9905.

Kochian LV (1995). Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 46: 237-260.

Kochian LV, Hoekenga OA and Pineros MA (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55:459-493.

Krill AM, Kirst M, Kochian LV, Buckler ES, Hoekenga OA: (2010). Association and linkage analysis of aluminum tolerance genes in maize. *Plos One*, 5: 1-11.

Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM, Cancel JD (2005) *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance. *Plant Journal* 41: 353-363.

Ligaba A, Maron L, Shaff J, Kochian L, Piñeros M: (2012). Maize *ZmALMT2* is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ*, in press.

Liu JP, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV (2009) Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant Journal*. 57, 389-399.

Ma JF, Hiradate S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211:355–60.

Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*. 6: 273-278.

Magalhaes JV, Garvin DF, Wang YH, Sorrellis ME, Klein PE, Schaffert RE, Li L, Kochian LV (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics*. 167, 1905-1914.

Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang Y, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV.. (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*. 39, 1156-1161.

Magnavaca R, Gardner CO, Clark RB (1987) Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: HW Gabelman, BC Loughman, eds, Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, pp 201-212.

Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, et al. (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* 61: 728-740.

Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi E. (1976). Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiology* 17:627-631.

Ninamango-Cardenas F, Guimarães CT, Martins P, Parentoni SN, Carneiro NP, et al. (2003) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica* 130: 223–232.

Pandey S e Gardner CO. (1992). Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. *Adv Agron.* 48, 1-87.

Pellet DM; Grunes DL, Kochian LV. (1995) Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.) *Planta* 196:788-795

Piñeros MA, Magalhaes JV, Carvalho Alves VM, Kochian LV. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiology* 129:1194-1206.

Piñeros MA, Shaff JE, Manslank HS, Alves VMC, Kochian LV. (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology* 137:321-241.

Rao IM, Zeigler RS, Vera R, Sarkarung S (1993) Selection and Breeding for Acid-Soil Tolerance in Crops. *BioScience* 43: 454.

Riede CR, Anderson JA. (1996). Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Science.* 36:905–9.

Rhue RD, Grogan CO, Stockmeyer EW, Everett HL. (1978). Genetic control of aluminum tolerance in corn. *Crop Science.* 18, 1063-1067.

Ryan PR, Shaff JE, Kochian LV. (1993). Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiology* 99:1193-1200.

Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Delhaize, E, Matsumoto, H. (2004), A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37: 645–653.

Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y et al. (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiology.* 150, 281-294.

Sibov ST, Gaspar MJ, Ottoboni LMM, Arruda P, Souza AP. (1999). Two genes controlling aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome*, 42:475-482.

von Uexküll H.R. e Mutert E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. In: *Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*. RA Date, NJ Grundon, GE Raymet, and ME Probert (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 5-19.

Yamaji N, e Ma JF. (2007). Spatial distribution and temporal variation of the rice silicon transporter *Lsi*. *Plant Physiology*. 143, 1306-1313.

Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, et al. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 3339-3349.

Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in Rice. *The Plant Journal* 68, 1061–1069.

Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Sci U S A* 107: 18381-18385.

Capítulo 1

Caracterização de novos genes candidatos associados com a tolerância ao alumínio em milho

1. Introdução

A toxidez causada pelo Al presente nos solos ácidos é um dos fatores limitantes para a produção mundial de grãos, principalmente nas regiões tropicais. Sob tais condições, o crescimento das raízes é drasticamente reduzido, limitando a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, a produção das culturas (Kochian et al., 1995). O milho é o cereal mais produzido no mundo, contribuindo tanto como uma *commoditie* chave na cadeia produtiva animal quanto para a subsistência humana em vários países da América Latina e África (Awika, 2011).

A tolerância ao Al em milho é uma característica complexa que envolve um grande número de genes e apresenta vários mecanismos fisiológicos para explicar esta tolerância (Magnavaca et al., 1987; Pandey et al., 1994; Lima et al., 1995; Piñeros et al., 2005). Vários genes de tolerância ao Al já foram identificados e caracterizados em plantas, incluindo transportadores de ácidos orgânicos, transportadores do tipo ABC, transportadores de Al³⁺ e fatores de transcrição.

Entre os transportadores de ácidos orgânicos, o *SbMATE* é gene principal responsável pela tolerância ao Al em sorgo, que codifica um transportador de citrato nos ápices radiculares desta espécie (Magalhães et al., 2007). Vários genes da família MATE foram caracterizados como controlando a tolerância ao Al em cevada (Furukawa et al., 2007), *Arabidopsis* (Liu et al., 2009) e arroz (Yokosho et al., 2011). Em milho, o gene *ZmMATE1* apresentou fortes evidências de atuar na exsudação de citrato e no aumento da tolerância ao Al em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (Maron et al., 2010). Outro transportador de ácidos orgânicos que já teve seus homólogos caracterizados em milho foi o gene *ALMT*, responsável pela tolerância ao Al em trigo via exsudação de malato (Sasaki et al., 2004). No entanto, membros da família *ALMT* não tiveram suas funções correlacionadas com o aumento da tolerância ao Al em milho (Piñeros et al., 2008; Ligaba et al., 2012). Fatores de transcrição do tipo *zing finger* foram identificados em *Arabidopsis* (*STOP1*, Iuchi et al., 2007) e em arroz (*ART1*, Yamaji et al., 2009), regulando a expressão de vários genes associados com a tolerância ao Al nas respectivas espécies. O gene *Nrat1* codifica um transportador de Al³⁺ presente na membrana plasmática das células de raiz, sendo

caracterizado como um componente importante no mecanismo de detoxificação interna do Al em arroz (Xia et al., 2010), provavelmente complementando o alto nível de tolerância ao Al apresentado pela espécie.

Vários genes de tolerância ao Al já foram caracterizados em plantas, mas em milho pouco ainda se sabe sobre os genes responsáveis por esta característica. Considerando a complexidade do genoma do milho e as evidências do envolvimento de múltiplos genes na tolerância ao Al tóxico, a busca por novos genes candidatos é de grande importância. Além da possibilidade de caracterização de novos mecanismos envolvidos na tolerância ao Al em milho, a identificação desses genes permite a exploração de novas fontes de tolerância, que podem ser incorporadas aos programas de melhoramento por meio da seleção assistida. Assim, os diferentes genes podem ser piramidados aumentando os patamares de tolerância ao Al e, possivelmente, a produtividade de grãos em solos ácidos, ou ainda a diminuição nos custos de produção. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi a identificação de novos genes candidatos nas regiões de QTLs de tolerância ao Al em milho.

2. Material e Métodos

2.1. Busca por Genes Candidatos

Inicialmente, a pesquisa por homólogos aos genes candidatos em milho se deu a partir de uma revisão bibliográfica priorizando os genes envolvidos com a tolerância ao Al em outras espécies, tais como: *Arabidopsis*, arroz e sorgo. As buscas foram realizadas por meio da ferramenta BLAST (Altschul et al., 1997) utilizando sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *SbMATE* (Magalhães et al., 2007), *STOP1* (Iuchi et al., 2007) e *Nrat1* (Xia et al., 2010), contra as sequências protéicas preditas no genoma do milho disponíveis no MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org>).

As proteínas preditas foram alinhadas para a realização de uma análise filogenética utilizando o software MEGA5 (www.megasoftware.net). A árvore filogenética foi construída utilizando máxima parcimônia e 100 bootstraps. Os genes com maiores níveis de similares de sequência com os genes funcionais de tolerância ao Al em outras espécies foram selecionados para as etapas posteriores.

2.2. População de mapeamento

Todas as informações sobre a população, o mapa de ligação e os QTLs de tolerância ao AI foram obtidas do trabalho de Simões (2012), que será rapidamente descrito a seguir. A população constituiu de 118 linhagens recombinantes endogâmicas (RILs) derivadas do cruzamento entre dois parentais contrastantes para a tolerância ao AI, Cateto AI237 e L53, tolerante e sensível, respectivamente. O mapa genético foi construído com 1159 marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e STS (*Sequence Tagged Sites*), distribuídos ao longo de 2508,2 cM do genoma do milho. A avaliação para a tolerância ao AI foi realizada em solução nutritiva contendo {39} μM de AI por cinco dias, utilizando o comprimento líquido relativo da raiz seminal (RNRG, *Relative Net Root Growth*) como índice fenotípico.

2.3. Mapeamento dos genes candidatos

Os genes candidatos com índices mais elevados de similaridade de sequência com os genes alvo foram selecionados, sendo dois para o *STOP1*, um para o *SbMATE* e um para o *Nrat1*. Três pares de *primers* foram desenhados para cada um desses genes candidatos utilizando a ferramenta Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os fragmentos foram amplificados entre os parentais da população utilizando 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 0,01% gelatina (m/v); 2,0 mM MgCl_2 ; 125 μM de cada um dos dNTPs; 10 μM de cada um dos *primers*, 5% DMSO 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, 94°C por 30 segundos, seguidos pela temperatura de anelamento em função de cada par de *primers* por 30 segundos e 72°C por 1:30 minutos em 35 ciclos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados em géis de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0) e corados com GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta no equipamento *Kodak Gel Logic 200 Imaging System*[®] (Carestream, Health, New Haven, CT).

Os produtos de amplificação foram extraídos do gel e purificados usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante. Estes fragmentos foram sequenciados utilizando o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) no sequenciador de DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas das linhagens parentais (Cateto AI237 e L53)

foram alinhadas no programa SeqMan v. 3.57 e Sequencher 4.1.4 para a busca de polimorfismos, sendo também comparados com a sequência do genoma do milho para confirmar a amplificação correta do gene candidato.

Os polimorfismos entre as linhagens parentais foram testados para a identificação de sítios de restrição por meio da ferramenta NEBcutter (<http://www.tools.ned.com/nebcutter2/>). Uma vez identificada a combinação de primer x enzima de restrição para cada gene candidato, os polimorfismos foram avaliados na população de 118 RILs.

Os genes candidatos foram testados quanto a segregação 1:1 na população de RILs pelo teste de chi-quadrado a 5% e testados quanto a sua melhor posição no mapa previamente construído por meio do programa MapMaker/EXP 3.0 (Lander et al., 1987), seguindo os critérios de LOD mínimo de 2, frequência de recombinação máxima de 0,4 e função de mapeamento de Kosambi.

O mapeamento dos QTLs foi realizado novamente para confirmar a co-localização com os genes candidatos utilizando a estratégia de mapeamento por intervalos múltiplos com auxílio do software QTL Cartographer 2.5 para Windows (Wang et al., 2007).

2.4. Análise de expressão do *ZmNrat1*

Um dos genes candidatos que localizou mais próximo aos QTLs de tolerância ao AI e apresentou evidências de estar em uma região sintênica entre os cromossomos de milho e arroz foi testado quanto ao perfil de expressão, o *ZmNrat1*. A tecido-especificidade foi avaliada utilizando o primeiro centímetro do ápice radicular, de 1 a 3 cm acima do ápice radicular e em folha. A expressão ao longo do tempo foi testada no tempo zero, e após 1, 3, 6, 24 e 72 horas de exposição a {39} μM de atividade de AI. A expressão do gene *ZmNrat1* foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando a metodologia Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para a análise foram usados como parentais as linhagens contrastantes Cateto AI237 e L53, tolerante e sensível ao AI, respectivamente.

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura diurna média de $27\pm 3^\circ\text{C}$ e noturna de $20\pm 3^\circ\text{C}$, intensidade luminosa de $330 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 12 horas de fotoperíodo. As sementes foram desinfetadas utilizando 0.5% (w/v) de NaOH por 5 minutos sob agitação de 160 rpm e posteriormente lavadas com água deionizada. As semente foram germinadas por 4 dias com 16 horas de fotoperíodo em temperatura de 30°C em papel de germinação umedecido. Após os 4 dias, as plântulas foram transferidas para copos de polietileno contendo duas plântulas por copo e imersas em solução nutritiva descrita por Magnavaca et al. (1987) com o pH aferido para 4.0 e sobre aeração contínua.

As plântulas foram aclimatadas por 24 horas nessa solução, a partir de quando foram iniciados os tratamentos na solução contendo {39} μM de atividade de Al, sendo que o controle foi realizado no tempo zero sem Al, antes de submissão das plantas ao estresse. Os tempos sob estresse de Al foram após de 1, 3, 6, 24 e 72 horas. Cada amostra biológica, representando uma linhagem em um determinado tempo, constituiu de um conjunto de tecidos de 14 plantas e foram feitas três repetições técnicas para a análise da expressão relativa.

As amostras foram armazenadas em freezer -80°C e a extração do RNA total foi feita para cada amostra biológica, utilizando o kit de extração RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). As amostras foram quantificadas e a pureza do RNA verificada por meio da leitura a 260 e 280 nm utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 3000 (Thermo Fisher Scientific, Worcester, MA). A verificação da integridade do RNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão Tris-acetato EDTA (TAE) 1x, corados com GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium). A eletroforese foi realizada a 200V por 15 min e o gel visualizado no sistema de fotodocumentação *Kodak Gel Logic 200 Imaging System*® (Carestream, Health, New Haven, CT). Para a obtenção do cDNA, foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação de síntese do cDNA foi efetuada para um volume final de 10 μL , utilizando 1 μg de RNA total, *RT Random primers* e Transcriptase Reversa. As condições de amplificação foram 25°C por 10 min, 37°C por 2h e 85°C por 5 min. A quantificação relativa da expressão do gene *ZmNrat1* foi feita utilizando-se o kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) desenhado para o gene *ZmNrat1*, utilizando os *primers* F: 5'-CGCGCTTCTGATCCAAACA-3' e R: 5'-GCGAGATGCTTGCCTGTCTT-3'. A expressão endógena foi quantificada com o controle interno 18S RNA.

3. Resultados e Discussão

3.1. Candidatos similares ao gene *STOP1*

Foram identificados cinco genes candidatos no genoma do milho, com identidade de sequência superior a 40% em relação ao *STOP1* de *Arabidopsis* (Tabela 1). Os dois genes cujas proteínas preditas tiveram maior identidade com o *STOP1* foram GRMZM2G075956 (54,3%) e GRMZM2G129428 (53,3%), localizados nos cromossomos 8 e 3, respectivamente (Figura 1).

Tabela 1: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes candidatos similares ao *STOP1* no genoma do milho.

Genes Candidatos	e-value	Identidade (%)	Cromossomo	Posição (pb)
GRMZM2G075956	6.1e-120	54,3	8	166.077.536
GRMZM2G129428	1.3e-116	53,3	3	174.460.511
GRMZM2G068710	4.8e-94	49,3	10	10.135.185
GRMZM2G023988	1.2e-58	54,0	5	175.683.554
GRMZM2G470422	3e-51	43,7	1	296.767.085

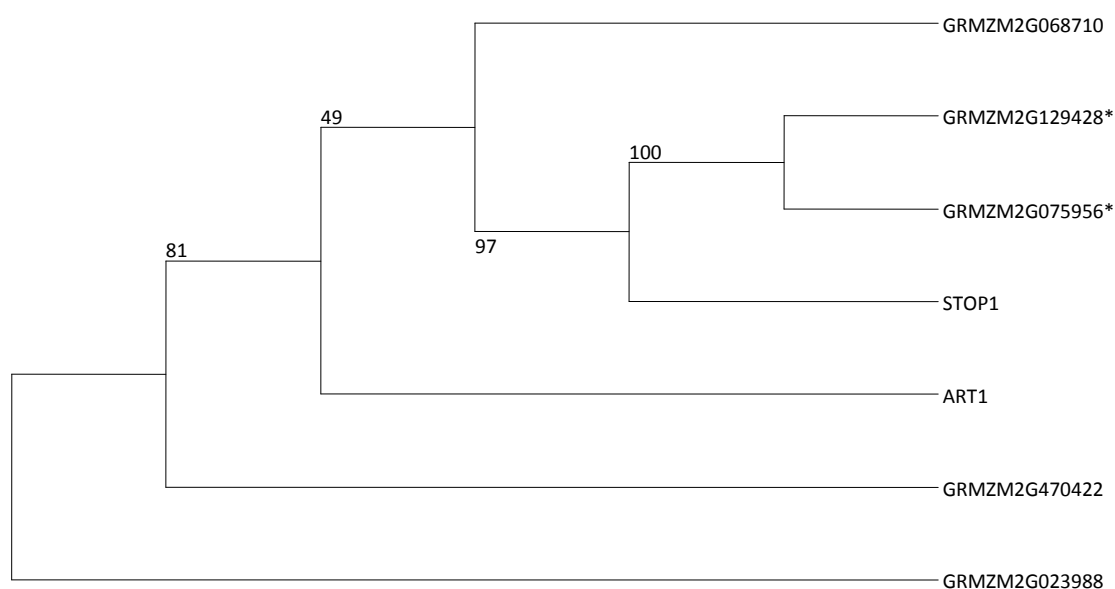


Figura 1: Árvore filogenética construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos de STOP1, ART1 e dos genes candidatos preditos no genoma do milho, por meio da máxima parcimônia.

Para o gene candidato GRMZM2G075956, o polimorfismo foi mapeado pela amplificação com os *primers* F: 5`-CCCGGGAGCCGCAATTCCAT-3` e R: 5`-AATCCAGTGGCAGAGCTCCTGC-3`, seguida pela restrição do fragmento com a enzima *MspI* e visualizado em gel de agarose. Este gene foi mapeado no cromossomo 8 a 4,6 cM do marcador S8_165596679 e 1,3 cM do S8_166624082 (seta na figura 2), coincidindo com a posição física predita de 166,1 Mpb (Mega pares de base).

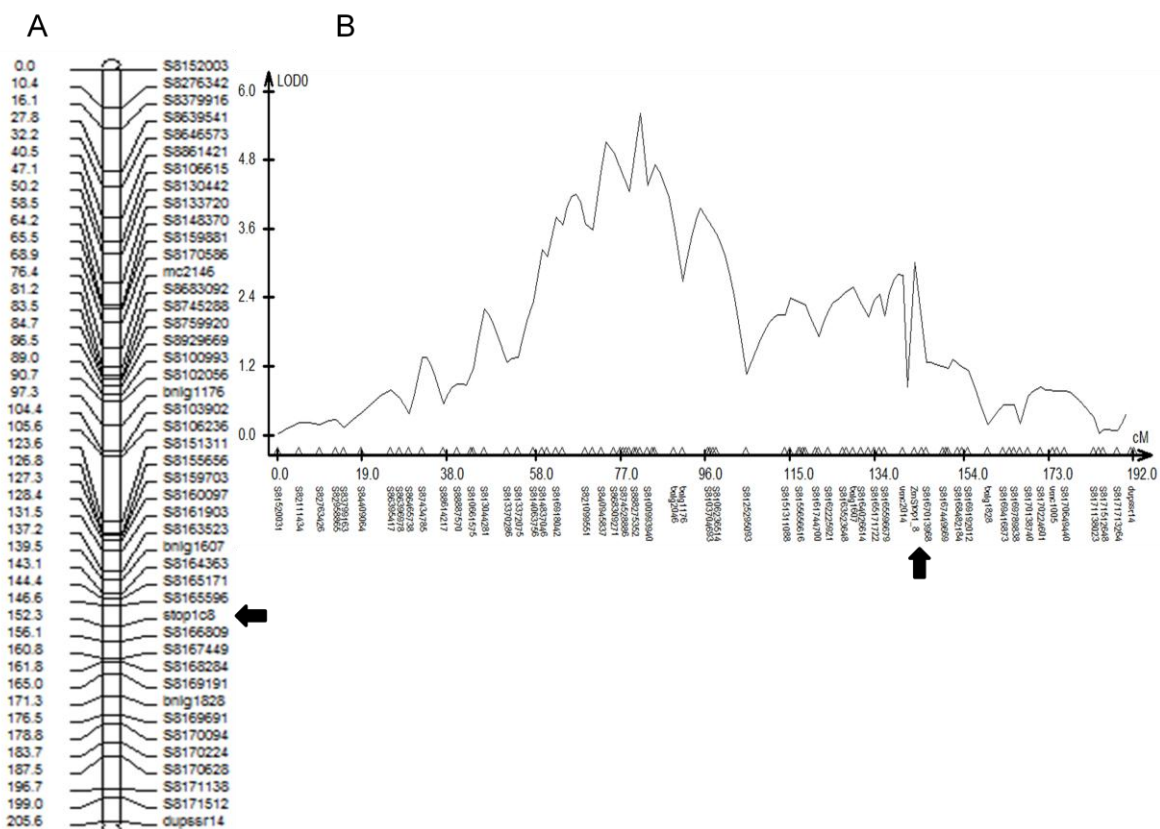


Figura 2: QTL de tolerância ao AI mapeado no cromossomo 8 de milho e a posição do gene candidato GRMZM2G129428, com alta similaridade ao *STOP1* de *Arabidopsis*.

Para o gene candidato de milho similar ao *STOP1* localizado no cromossomo 3 (GRMZM2G129428), o polimorfismo entre os parentais foi obtido pela clivagem do produto da amplificação pelo par de *primer* F: 5'-TTGATCGACCTTTGGGTTGCGT-3' e R: 5'-AGACGCCGAGGTCAGGGACTC-3' com a enzima *MspI*, seguido pela visualização em gel de agarose.

Este gene foi mapeado no cromossomo 3 de milho entre os marcadores S3_173292886 e S3_174775672, indicado pelas setas na figura 3. Sua posição genética coincide com a localização física predita (175,7 Mpb) com base na sequência do genoma na linhagem B73 disponível no MaizeSequence (www.maizesequence.org). No entanto, após o mapeamento dos QTLs utilizando o mapa de ligação construído com os novos genes candidatos, nenhum desses genes foram co-localizados no intervalo de confiança dos QTLs de tolerância ao AI, mapeados nos respectivos 8 e 3, previamente identificados por Simões (2012).

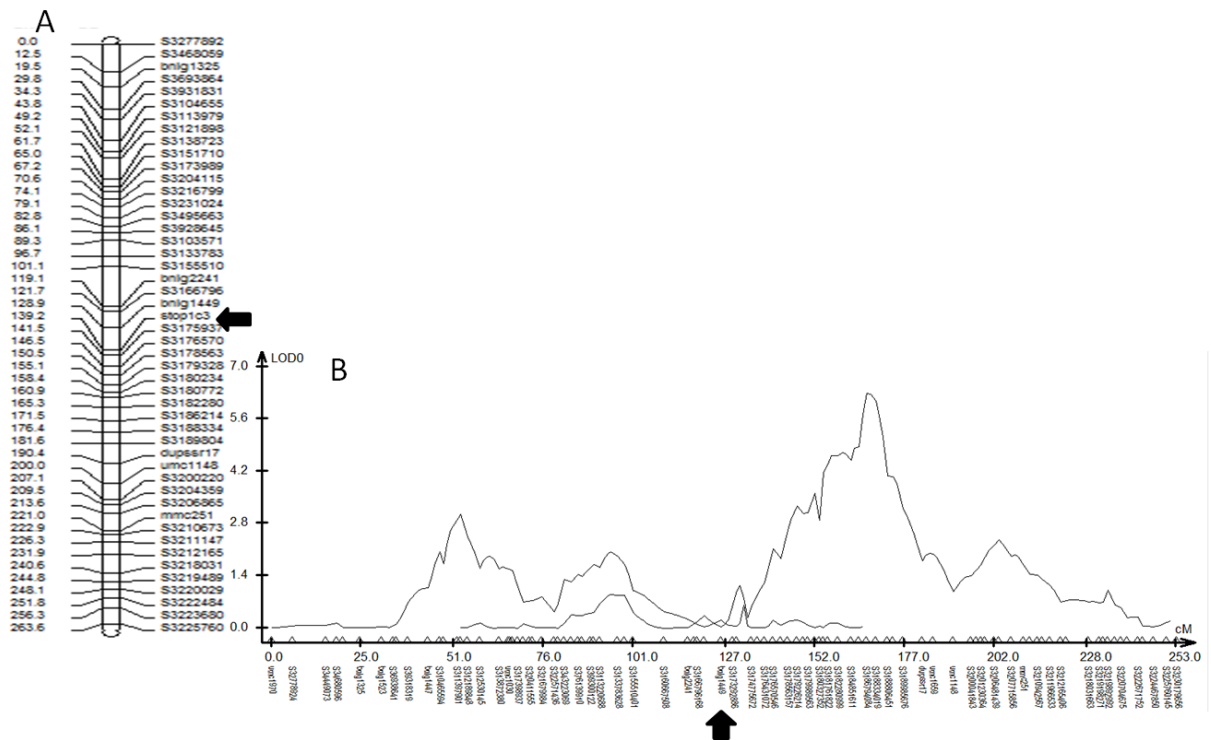


Figura 3: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 3 de milho, *qALT3-1* e *qALT3-2*, em relação à posição do gene candidato GRMZM2G129428, homólogo ao *STOP1* de *Arabidopsis*.

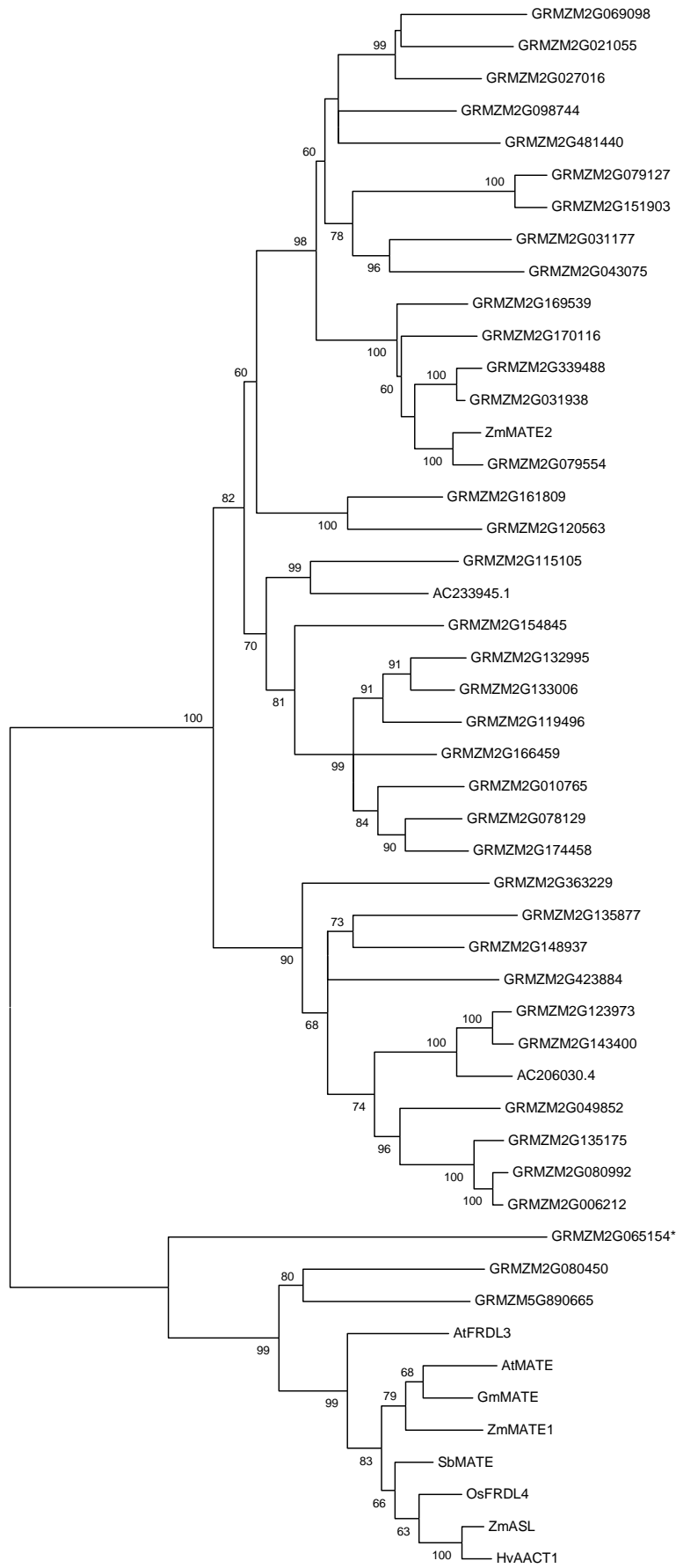
Os genes *STOP1* e *ART1* regulam a expressão de vários genes envolvidos com a tolerância ao Al em *Arabidopsis* e arroz, respectivamente (Luchi et al., 2007; Yamaji et al., 2009). Dentre esses genes, podemos destacar dois membros da família MATE em *Arabidopsis*, *AtMATE* (Liu et al., 2009) e em arroz, *OsFRDL4* (Yokosho et al., 2011). Como já foi demonstrada a existência do *ZmMATE1* possivelmente relacionado com a tolerância ao Al em milho (Maron et al., 2010), seria esperado que a expressão desse gene fosse também controlada por um homólogo desses fatores de transcrição. No entanto, Simões (2012) demonstrou que 80% da expressão do *ZmMATE1* foi controlada por fator(es) genético(s) localizado em uma região de 2 Mb flanqueando o gene, onde não foi predito nenhum homólogo do *STOP1* ou *ART1*. Assim, podemos sugerir que, pelo menos nessa população de mapeamento, os dois possíveis homólogos do *STOP1* em milho não estão envolvidos com a tolerância ao Al, uma vez que não foram co-localizados nas regiões de QTLs. Tal fato pode estar justificado pela expressão do *ZmMATE1* estar controlada em grande parte por fatores em *cis* (Simões, 2012). No entanto, não podemos descartar que existam homólogos funcionais de *STOP1* em milho, uma vez que utilizamos uma população bi-parental, onde apenas o *ZmMATE1* foi validado como responsável pela tolerância ao Al.

Adicionalmente, o *ART1*, ortólogo ao *STOP1*, controla a expressão de genes de tolerância ao AI em estoques mutantes de arroz, incluindo do *OsFRDL4* (Yokohosho et al., 2011). Apesar de ter sido identificado um QTL explicando aproximadamente 19% da variação para tolerância ao AI em uma região genômica onde o *ART1* está fisicamente localizado, não houve associação desse gene com variação natural para tolerância ao AI em um painel de ampla diversidade em arroz (Famoso et al., 2011). Assim, não foi possível fazer maiores inferências sobre a existência de homólogos funcionais dos genes *ART1/STOP1* em milho.

3.2. Candidatos similares ao gene *SbMATE*

Simões (2012) apresentou uma análise filogenética detalhada envolvendo 43 membros da família MATE de milho, que foram divididos em dois grandes grupos (Figura 4). O grupo mais importante inclui cinco genes preditos em milho, que foram agrupados junto com transportadores de citrato previamente validados e associados com tolerância ao AI em várias espécies. Dentre esses genes preditos, o *ZmMATE1* foi caracterizado como transportador de citrato, co-localizado com um QTL de tolerância ao AI (Maron et al., 2010), sendo validado em linhagens semi-isogênicas de milho (Simões, 2012). Já o gene *ZmASL* foi associado com tolerância ao AI em um painel de ampla diversidade genética em milho e em uma população bi-parental de origem temperada (Krill et al., 2010). No entanto, não foi apresentada qualquer evidência funcional da sua atuação na tolerância ao AI em milho, nem foi detectado QTL na região genômica onde o *ZmALS* foi mapeado (Simões, 2012).

Assim, dentre os três demais membros MATE agrupados junto com transportadores de citrato, foi selecionado o gene predito GRMZM2G065154, que apresenta 69,5% de identidade com o *SbMATE* (Tabela 2).



0.2

Figura 4: Árvore filogenética de máxima verossimilhança com base no alinhamento das sequências aminoacídicas das proteínas codificadas pelos genes funcionais da família MATE associados com tolerância ao AI e seus homólogos hipotéticos em milho.

Tabela 2: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes candidatos similares ao *SbMATE* no genoma do milho.

Genes Candidatos	e-value	Identidade (%)	Cromossomo	Posição (pb)
GRMZM2G065154	2.4e-173	69,5	5	71.702.839
GRMZM2G89665	9.7e-70	41,0	2	152.913.993
GRMZM2G080450	1.3e-67	44,7	3	57.082.118

O mapeamento desse gene candidato foi realizado pela amplificação do DNA genômico com o par de *primers* F: 5'-ACTTTGTGTGCTCGTGCTTGCT-3' e R: 5'-GGGGTGATGCCGTGATAACATTGCA-3', cujo polimorfismo foi detectado pela presença/ausência do fragmento amplificado em gel de agarose. O gene GRMZM2G065154 foi mapeado no cromossomo 5 entre os marcadores S5_69456396 e o *ZmNrat1*, indicado pelas setas a figura 5, compatível com a sua posição predita no genoma do milho (71, Mb). No entanto, essa posição está fora do intervalo de confiança dos QTLs de tolerância ao AI *qALT5-1* e *qALT5-2*, mapeados por Simões (2012). Assim, não foi apresentada evidência genética do envolvimento desse membro MATE na tolerância ao AI em milho na referida população.

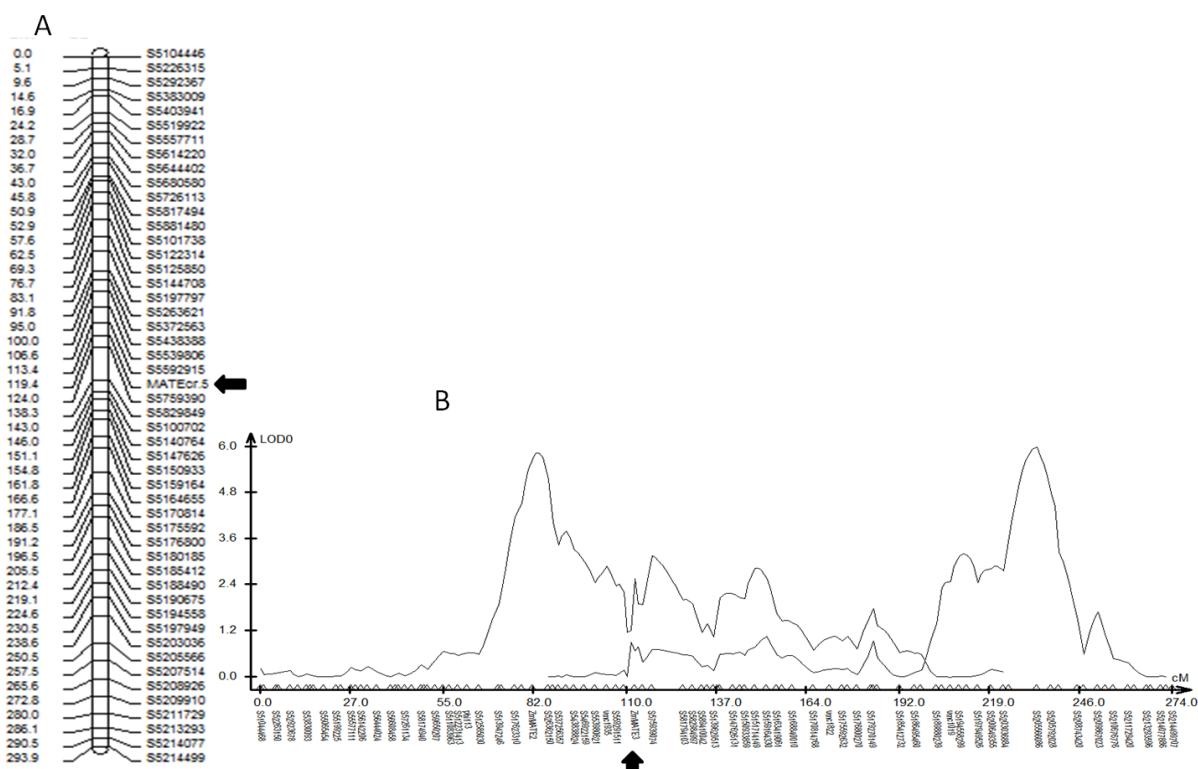


Figura 5: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao AI mapeados no cromossomo 5 de milho, *qALT5-1* e *qALT5-2*, e a posição genética do gene candidato GRMZM2G065154.

3.3. Candidatos similares ao gene *Nrat1*

Para o *Nrat1*, foram identificados cinco genes preditos com identidade superior a 40% (Tabela 3), sendo que o gene com maior similaridade de seqüências de aminoácidos com o *Nrat1* de arroz (82,7%) foi o GRMZM2G168747 (Figura 6).

Tabela 3: Identificação, e-value, identidade e posição no cromossomo dos genes candidatos similares ao *Nrat1* no genoma do milho.

Genes Candidatos	e-value	Identidade (%)	Cromossomo	Posição (pb)
GRMZM2G168747	8.7e-166	82,7	5	74.616.918
GRMZM2G147560	4e-123	61,9	7	26.963.762
GRMZM2G069198	7.2e-132	58,4	5	43.146.138
GRMZM2G366919	6.9e-127	54,2	2	170.851.138
GRMZM2G322844	6.2e-80	45,0	2	223.720.037

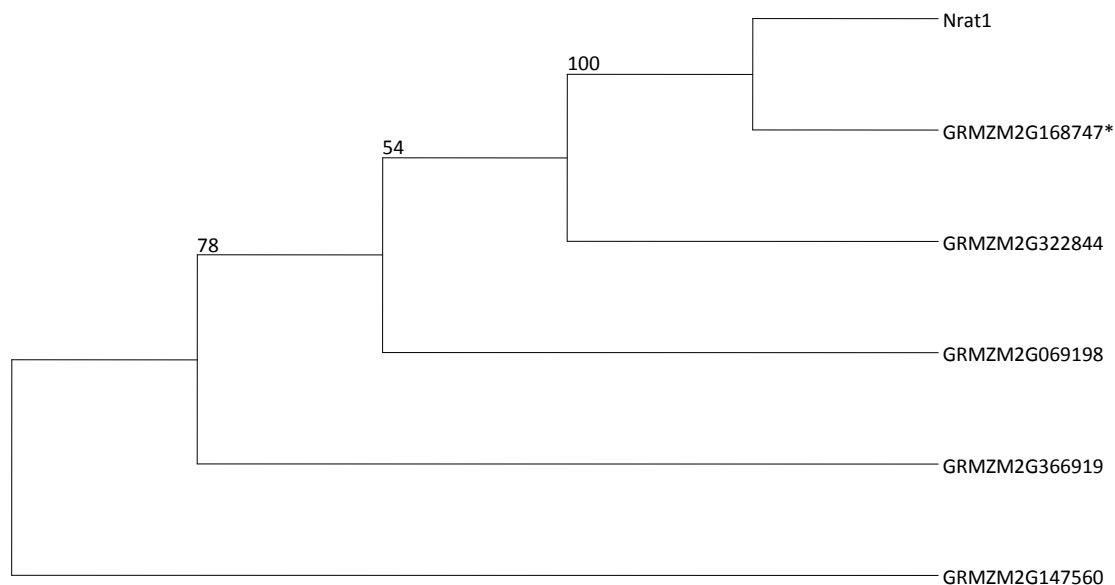


Figura 6: Árvore filogenética construída com base no alinhamento das sequências de aminoácidos do *Nrat1* e dos genes candidatos preditos no genoma do milho por meio da máxima parcimônia.

Para o gene candidato com alta similaridade ao gene *Nrat1* (GRMZM2G069198) o polimorfismo entre os parentais foi obtido pela amplificação com o par de *primers* F: 5'-CGCGGAAACAGGAACCAAACCAAAA-3' e R: 5'-CGGGTCTCTGCGTACCCCGA-3' seguido pela clivagem com a enzima *HinfI* e visualização em gel de agarose. Este gene foi mapeado no cromossomo 5 de milho entre os marcadores S5_69456396 e S5_75939074, indicado pelas setas na figura 7. Sua posição coincide com a localização predita de 74,6 Mpb, com base na sequência de genoma na linhagem B73 disponível no MaizeSequence.

Apesar do *ZmNrat1* ter da localizado fora do intervalo de confiança do QTL *qALT5-1*, identificado por Simões et al. (2012), existem evidências de sintenia entre as regiões do cromossomo 2 de arroz e do cromossomo 5 de milho, além da predição de ortologia entre os genes GRMZM2G168747 e LOC_Os02b03900 pelo Gramene (www.gramene.org), justificando as análises subsequentes com base no padrão de expressão desse gene candidato.

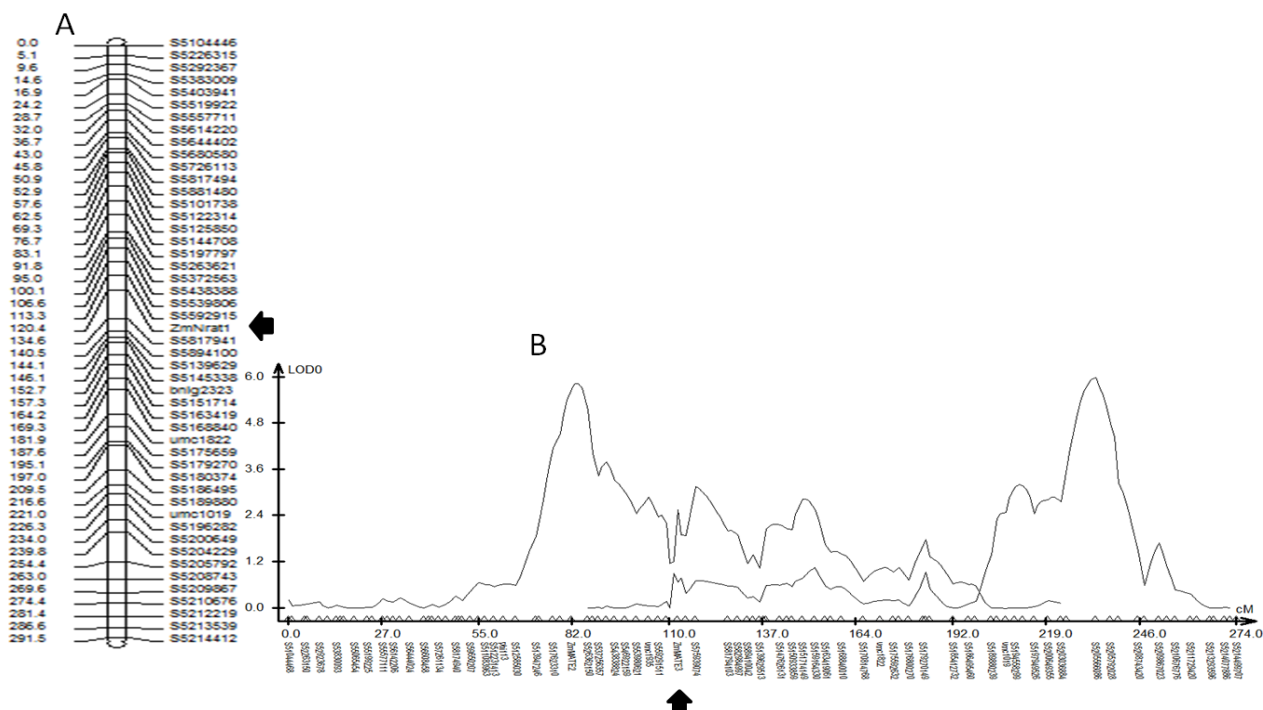


Figura 7: Distribuição dos dois QTLs de tolerância ao Al mapeados no cromossomo 5 de milho, *qALT5-1* e *qALT5-2*, em relação à posição genética do gene candidato GRMZM2G069198.

3.4. Análise da expressão do *ZmNrat1*

A expressão do gene *ZmNrat1* foi específica no ápice radicular e na região entre 1 e 3 cm da raiz, não sendo expresso em folha (Figura 8), à semelhança do *Nrat1* de arroz que não foi expresso em folha (Xia et al., 2010). Adicionalmente, *ZmNrat1* foi induzido diferencialmente pelo Al nas linhagens sensível e tolerante ao Al, em ambos os segmentos da raiz avaliados.

Assim, a expressão do *ZmNrat1* foi avaliada nos dois segmentos da raiz ao longo do tempo após o estresse de Al. No ápice radicular, foi observada uma indução da expressão do *ZmNrat1* após uma hora do tratamento com Al nas linhagens tolerante e sensível, apresentando um perfil de expressão bastante similar entre as linhagens ao longo do tempo (Figura 9). No entanto, a indução ocorreu de forma mais lenta na linhagem sensível, atingindo a expressão máxima três horas após o estresse de Al, cujo patamar foi mantido até 24 horas de estresse. Na linhagem tolerante, o pico máximo de indução do *ZmNrat1* ocorreu uma hora após o estresse de Al, caindo após 24 horas em solução nutritiva contendo 39 μM de Al.

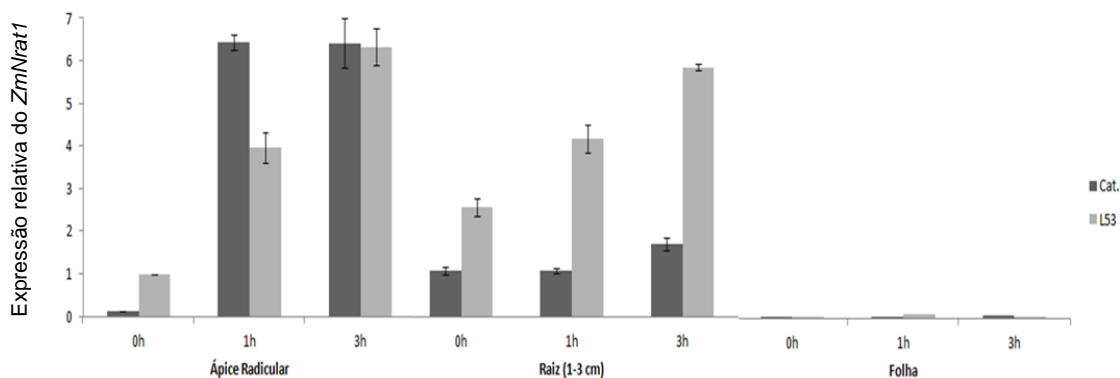


Figura 8: Expressão do gene *ZmNrat1* nos tecidos do ápice radicular, da raiz basal (1-3 cm acima do ápice radicular) e da folha nos tempos de 0, 1 e 3 horas.

Estes resultados são altamente compatíveis com o perfil de expressão do *Nrat1* em arroz, cuja expressão foi induzida pela presença de Al atingindo níveis máximos de expressão entre 3 e 6 horas de exposição ao Al (Xia et al., 2010). Adicionalmente, no experimento de microarranjos utilizando as linhagens Cat100-6 e L53, como genótipos de milho tolerante e sensíveis ao Al, Maron et al. (2008) identificaram um oligoMZ00052211, que representa o gene predito GRMZM2G069198, diferencialmente expresso em ambas as linhagens, após 2, 6 e 24 horas de exposição ao Al, em comparação com o tratamento controle sem Al, exceto para a linhagem L53 após 2 horas de tratamento com Al. Esse perfil de expressão é altamente coerente com o padrão obtido por PCR quantitativo, utilizando uma outra fonte de tolerância ao Al, mas também derivada das raças de milho Cateto.

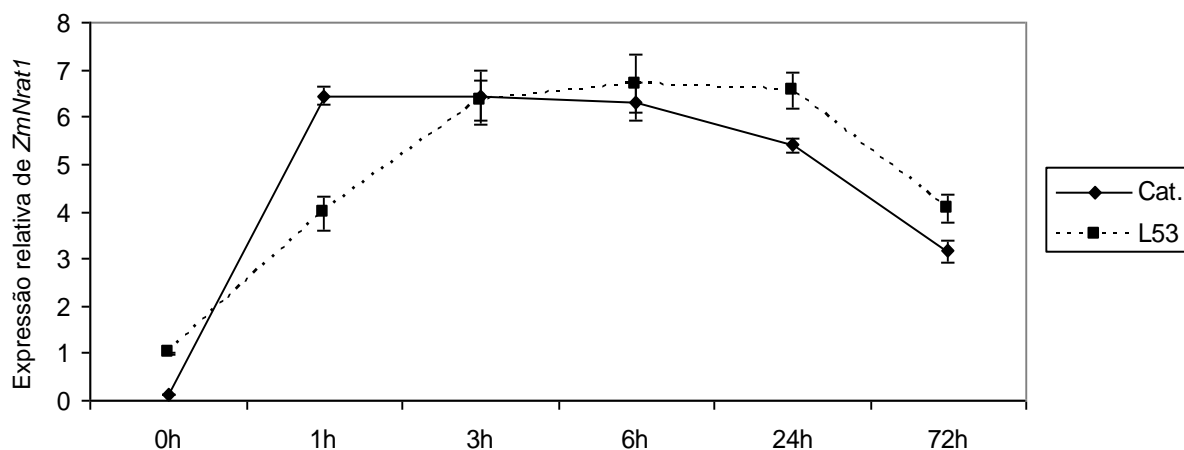


Figura 9: Expressão do gene *ZmNrat1* no ápice radicular das linhagens tolerante (Cateto Al237) e sensível (L53) na presença de {39} μM de Al, em comparação com o controle no tempo zero e na ausência de Al.

Já na região entre 1 e 3 cm do ápice radicular, a linhagem tolerante não mostrou uma variação na expressão do gene *ZmNrat1* ao longo do tempo. Por outro lado, na linhagem sensível a expressão do *ZmNrat1* foi induzida após 1 hora de exposição ao Al, atingindo seu máximo com 3 horas, e caindo para níveis basais 6 horas após o tratamento com Al (Figura 10).

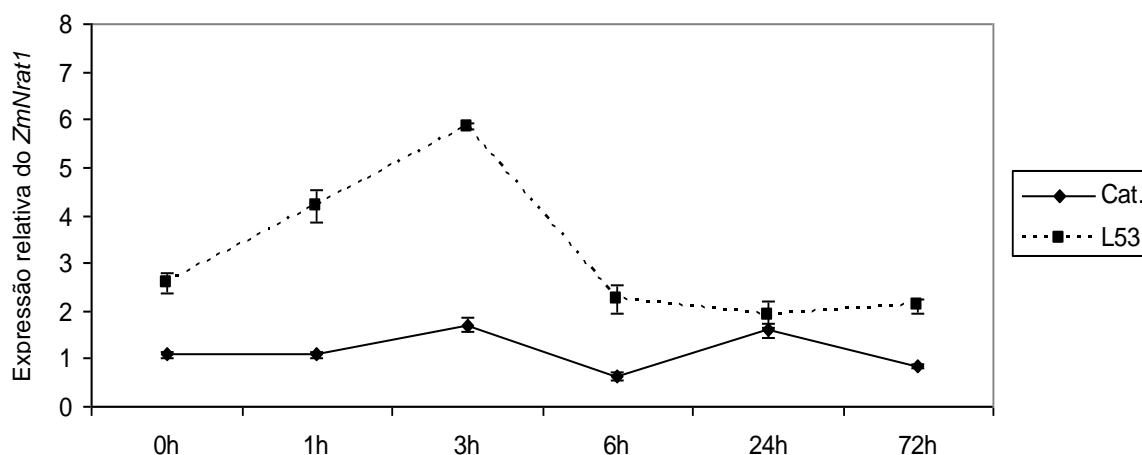


Figura 10: Expressão do gene *ZmNrat1* na região mediana da raiz (1-3 cm do ápice radicular) das linhagens tolerante (Cateto AI237) e sensível (L53) na presença de {39} μM de Al, em comparação com o controle no tempo zero e na ausência de Al.

A expressão do *ZmNrat1* no ápice radicular de milho foi bastante similar ao perfil descrito para o *Nrat1* na raiz de arroz, ambas as proteínas possuem elevada similaridade da sequência (82,7%), cujos genes estão localizados em regiões cromossômicas sintênicas entre arroz e milho. Tais evidências sugerem que o *ZmNrat1* seja um ortólogo do *Nrat1* de arroz. No entanto, a única evidência que suportaria o efeito positivo do *ZmNrat1* na tolerância ao Al entre as linhagens de milho contrastantes avaliadas no presente trabalho, seria a superioridade na sua indução na primeira hora após o estresse de Al. Como o ápice radicular é o sítio primário de atuação do Al, a expressão do *ZmNrat1* de quase duas vezes maior na linhagem tolerante 1 hora após a exposição ao Al em relação à linhagem sensível, poderia ser suficiente para complementar a tolerância ao Al na linhagem Catelo AI237.

No caso do *Nrat1*, foi observado um aumento na suscetibilidade ao Al em mutantes de arroz defeituosos para o *Nrat1* (Xia et al., 2010). Adicionalmente, foram identificados polimorfismos na região genômica contendo o gene *Nrat1* associados com variação natural para tolerância ao Al apenas na subpopulação *aus* de arroz, cujos haplótipos associados com tolerância ao Al foram encontrados em variedades tropicais do subgrupo *japonica*

(Famoso et al., 2011). De forma interessante, ambas as linhagens de milho tolerantes ao Al que apresentaram uma expressão superior do *ZmNrat1* entre 1 e 2 horas de exposição ao Al tóxico, em comparação com a linhagem sensível L53, são derivadas das raças de milho Cateto. Essas raças de milho são originárias da América do Sul e foram amplamente cultivadas no Brasil até a década de 70, provavelmente devido à alta adaptabilidade aos solos ácidos (Paterniani e Goodman, 1977).

Já nos tecidos de 1-3 cm acima do ápice radicular, a indução do *ZmNrat1* ocorreu apenas na linhagem sensível, entre 1 e 3 horas de exposição ao Al, sendo possível sugerir que o mecanismo de detoxificação interna do Al^{3+} não seja tão eficiente quanto no ápice radicular, o que resultaria em um acúmulo de Al^{3+} nessas células, contribuindo para agravar a sua toxicidade na linhagem sensível. Outra hipótese seria que o *Nrat1*, apesar de ter sido associado com o aumento da tolerância ao Al em mutantes de arroz, esse mecanismo não esteja relacionado com a variabilidade natural para a tolerância ao Al entre os parentais contrastantes avaliados no presente trabalho. No entanto, tais hipóteses precisam de estudos adicionais.

4. Conclusão

Foram identificados genes candidatos homólogos aos genes *STOP1*, *SbMATE* e *Nrat1*, que controlam a tolerância ao Al em *Arabidopsis*, sorgo e arroz, respectivamente. Esses genes foram mapeados na população de RILs derivada do cruzamento de parentais contrastantes para a tolerância ao Al, mas não houve uma co-localização evidente com os QTLs de tolerância ao Al previamente identificados. No entanto, para o gene candidato *ZmNrat1*, a análise de expressão forneceu informações importantes sobre o padrão de expressão tecido-específica na raiz e indução diferencial ao longo do tempo após a exposição ao Al, sendo altamente similar ao padrão de expressão do *Nrat1*. Considerando a elevada similaridade de sequência aminoacídica e do padrão de expressão dos genes *ZmNrat1* e *Nrat1*, podemos sugerir uma possível relação de ortologia entre os genes. No entanto, o envolvimento do *ZmNrat1* na tolerância ao Al entre as linhagens contrastantes requer estudos adicionais.

5. Referências Bibliográficas

Altschul AF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25, 17 3389–3402.

Awika JM. (2011). Major Cereal Grains Production and Use around the World. In *Advances in Cereal Science: Implications to Food Processing and Health Promotion*; Awika, J., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC.

Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung C-W, Wright MH, et al. (2011) Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. *PLoS Genet* 7(8): e1002221. doi:10.1371/journal.pgen.1002221.

Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y et al. (2007). Na aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant and Cell Physiology* 48: 1081-1091.

Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, et al. (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Sci U S A* 104: 9900-9905.

Kochian LV, Hoekenga OA and Pineros MA (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55:459-493.

Krill AM, Kirst M, Kochian LV, Buckler ES, Hoekenga OA: (2010). Association and linkage analysis of aluminum tolerance genes in maize. *Plos One*, 5: 1-11.

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L: (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1:174-81.

Ligaba A, MaronL, Shaff J, Kochian L, Piñeros M: (2012). Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ*, in press.

Liu JP, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV (2009) Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant Journal*. 57, 389-399.

Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT et al. (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*. 39, 1156-1161.

Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, et al. (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* 61: 728-740.

Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV: Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytologist* 2008, 179:116-128.

Paterniani, E.; Goodman, M. M. 1977. Races of maize in Brazil and adjacent areas. 100 pp.

Piñeros MA, Cançado GMA, Maron LG, Lyi SM, Menossi M, Kochian LV. (2008). Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 – an anion-selective transporter. *The Plant Journal*. 53, 352–367.

Piñeros MA, Shaff JE, Manslank HS, Alves VMC, Kochian LV. (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology* 137:321-241.

Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Delhaize, E, Matsumoto, H. (2004), A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal*, 37: 645–653.

Simões CC. (2012). Abordagens genético-genômicas para identificação e validação de QTLs de tolerância ao alumínio em milho. 54f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais.

Wang S, Basten CJ, Zeng Z: (2007). Windows QTL Cartographer 2.5. N.C. State University, Bioinformatics Research Center, USA.

Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, et al. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 3339-3349.

Yokosho K, Yamaji N, Ma JF. (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in Rice. *The Plant Journal* 68, 1061–1069.

Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Sci U S A* 107: 18381-18385.

Capítulo 2

Validação do QTL de tolerância ao alumínio (*qALT6*) em milho quanto à produção de grãos sob diferentes níveis de saturação de Al no solo

1. Introdução

A tolerância ao Al em milho é uma característica complexa controlada por vários genes (Magnavaca et al., 1987; Pandey et al., 1994; Lima et al., 1995). Dessa forma, o mapeamento de regiões cromossômicas controlando características quantitativas ou *quantitative trait loci* (QTLs) é uma estratégia molecular de grande potencial para melhor compreender os mecanismos envolvidos na tolerância ao Al, com amplas possibilidades para utilização em programas de melhoramento.

Apesar da tolerância ao Al ser intensamente estudada em gramíneas, poucos foram os estudos relatando o mapeamento de QTLs associados com a tolerância ao Al em milho (Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003; Conceição et al., 2009). Sibov et al. (1999) utilizando marcadores do tipo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e análises de *bulks* segregantes (BSA, *Bulked Segregant Analysis*) identificaram dois locos de maior efeito para a tolerância ao Al em milho nos cromossomos 6 e 10, sendo que o loco no cromossomo 10 teve um efeito maior e foi considerado como o responsável pela maior parte da variabilidade da característica. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) realizaram análises pelo método de *bulks* segregantes com marcadores SSRs (*Simple Sequence Repeat*) e RFLP. Esses autores identificaram cinco QTLs nos cromossomos 2, 6 e 8 do milho, explicando 60% da variação fenotípica, onde a única região comum entre os dois estudos foi o QTL no cromossomo 6, bin 6.00. Conceição et al. (2009) mapearam cinco QTLs explicando 41% da variação fenotípica da tolerância ao Al em cruzamentos dialélicos com três linhagens sensíveis e duas tolerantes, confirmando os QTLs encontrados por Ninamango-Cárdenas et al. (2003) e por Sibov et al. (1999), além de encontrar um QTL no cromossomo 4 para a tolerância ao Al. Krill et al. (2010) combinando genética associativa com o mapeamento por ligação identificaram quatro novos genes candidatos para a tolerância ao Al, sendo que apenas o gene *ZmALMT2* foi caracterizado, entretanto sua análise funcional sugeriu que este gene não atua na tolerância ao Al em milho (Ligaba et al., 2012).

Recentemente, Simões (2012) aumentaram a saturação do mapa genético construído em uma população de 118 linhagens recombinantes endogâmicas (RILs)

utilizando marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) desenvolvidos com a técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS, Elshire et al., 2011). Nesse estudo foram identificadas nove regiões genômicas explicando conjuntamente 69% da variância fenotípica da tolerância ao Al. Dentre eles, um QTL mapeado no cromossomo 6, denominado *qALT6* explicou 22% da variância fenotípica da característica, cujo efeito no aumento da tolerância ao Al foi validado em linhagens de milho semi-isogênicas. Nesta região genômica foi confirmada a co-localização com o gene candidato *ZmMATE1*, previamente caracterizado por Maron et al. (2010). O gene *ZmMATE1* codifica um transportador de citrato da família MATE localizado na membrana plasmática do ápice radicular de linhagens de milho tolerantes ao Al (Maron et al., 2010). Esse gene apresenta alta similaridade com o gene *SbMATE* que controla grande parte da tolerância ao Al em sorgo (Magalhães et al., 2007). Evidências experimentais indicaram que plantas de *Arabidopsis* superexpressando *ZmMATE1* apresentaram um aumento na exsudação de citrato seguido por um aumento na tolerância ao Al.

Embora o *qALT6* tenha conferido um aumento na tolerância ao Al em linhagens semi-isogênicas de milho em solução nutritiva (Simões, 2012), a avaliação da tolerância em condições de campo é de fundamental importância para verificar a influência do *qALT6* nas fases posteriores de desenvolvimento da planta e na produção de grãos. Para isso, o presente trabalho propôs avaliar o efeito do QTL de tolerância ao Al (*qALT6*) nas características agrônomicas e na produtividade de grãos em condições de campo com diferentes níveis de saturação de Al.

2. Material e Métodos

2.1. Material Genético

Um conjunto de linhagens semi-isogênicas (NILs) foi gerado utilizando retrocruzamento assistido por marcadores moleculares. A linhagem Cateto Al237, tolerante ao Al, foi utilizada como doadora do *qALT6*, cuja região foi flanqueada pelos marcadores *ZmMATE1* e *umc1018*. A linhagem sensível ao Al, L53, foi utilizada como parental recorrente. As linhagens semi-isogênicas em RC₂F₃ apresentaram mais de 96% de similaridade com a L53, sendo selecionadas duas destas para o presente trabalho.

As duas linhagens semi-isogênicas, denominadas NIL05 e NIL13, assim como a recorrente, L53, foram cruzadas com as quatro linhagens elites do programa de

melhoramento, totalizando 12 híbridos simples, que foram avaliados no campo juntamente com dois híbridos comerciais da Embrapa, o BRS1010 e o BRS1040.

2.2. Delineamento experimental

As linhagens foram avaliadas em três ambientes, cujo solo foi corrigido nos primeiros 20 cm para 0%, 20% e 40% de saturação de Al. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com quatro repetições e cada parcela foi representada por uma linha de 5 metros, espaçadas de 70 cm entre linhas e 20 cm entre plantas. O plantio foi realizado com o dobro de sementes, sendo que aos 30 dias após o plantio, realizou-se desbaste, mantendo o estande ideal de 24 plantas por parcela.

Os híbridos simples foram avaliados em experimentos conduzidos nas faixas de 0% e 40% de saturação de Al. O delineamento experimental foi semelhante ao adotado para avaliação das linhagens, sendo utilizadas três repetições. As avaliações foram realizadas no ano agrícola de 2011/2012, na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

As características avaliadas em todos os experimentos foram:

- florescimento masculino (FM), em dias: correspondente ao número de dias da semeadura até a antese de 50% das plantas da parcela;
- florescimento feminino (FF), em dias; correspondente ao número de dias da semeadura até que 50% das plantas da parcela apresentassem estilo-estígmata visíveis;
- altura de planta (AP), em cm: medida com auxílio de uma régua, do solo até a inserção da folha bandeira (média de três plantas uniformes da parcela);
- estande: número de plantas por parcela;
- umidade de grãos por parcela: medido com auxílio de um medidor de umidades de grãos;
- produtividade de grãos (PG), em $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$: obtido pela pesagem dos grãos de cada parcela, corrigido para umidade de 13% e estande ideal, e, posteriormente, transformado em $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

2.3. Análises estatísticas

Inicialmente, foram realizadas análises de variância individuais por ambiente, segundo o modelo geral:

$$y_{ij} = m + r_i + g_i + e_{ij}, \text{ em que}$$

y_{ij} : observação referente ao genótipo i na repetição j ;

m : média geral do experimento;

r_i : efeito da repetição j ($j = 1, \dots, 4$, para linhagens, ou, $i = 1, \dots, 3$, para híbridos);

g_i : efeito do genótipo i ($i = 1, \dots, 4$, para linhagens, ou; $i = 1, \dots, 14$, para híbridos);

e_{ij} : erro experimental.

Após a verificação da homogeneidade de variância dos resíduos das análises individuais, foram realizadas análises conjuntas, considerando os ambientes com diferentes níveis de saturação por Al, de acordo com o modelo geral:

$$y_{ijk} = m + r_{i(k)} + g_i + a_k + ga_{(ik)} + e_{ij}, \text{ em que}$$

y_{ijk} : observação referente ao genótipo i na repetição j dentro do ambiente k ;

m : média geral do experimento;

r_i : efeito da repetição j ($j = 1, \dots, 4$, para linhagens, ou, $j = 1, \dots, 3$, para híbridos);

a_k : efeito do ambiente k ($k=1, \dots, 3$, para linhagens, ou, $k=1, 2$, para híbridos)

g_i : efeito do genótipo i ($i = 1, \dots, 4$, para linhagens, ou; $i = 1, \dots, 14$, para híbridos);

$ga_{(ik)}$: efeito da interação genótipos por ambientes;

e_{ij} : erro experimental médio.

As análises de variâncias foram realizadas no PROC GLM do SAS (Statistical Analysis System Institute - SAS Institute, 1999). Foram, também, obtidas as médias ajustadas para cada genótipo em cada ambiente e no conjunto dos ambientes. Para testar os contrastes entre médias foi utilizado o teste de t a 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito do *qALT6* nas linhagens semi-isogênicas

As análises de variâncias conjuntas para as linhagens referentes às características de florescimento feminino (FF), florescimento masculino (FM), altura de plantas (AP) e produtividade de grãos (PG) para os ambientes com 0%, 20% e 40% de saturação de Al estão apresentadas na tabela 1.

Os coeficientes de variação para as características avaliadas foram de baixa magnitude, o que indicou boa precisão experimental e confiabilidade dos dados. Esse mesmo comportamento foi observado nas análises individuais (Tabelas A1, A2 e A3), mesmo para os ambientes sob estresse, que tende a diminuir a precisão experimental devido a maior heterogeneidade ambiental entre as parcelas (Parentoni et al., 2011).

Para as características de florescimento masculino (FM) e feminino (FF), observou uma variação significativa pelo teste F ($p < 0,01$) entre as linhagens, indicando que houve variabilidade em relação à precocidade. Foi observada, também, diferença entre os ambientes. Em média, as linhagens foram mais tardias nos ambientes de estresse por saturação de Al, à semelhança dos resultados relatados por Parentoni et al. (2011). Esses autores também relataram que as plantas de milho tendem a apresentar florescimento mais tardio em condições de estresse pela deficiência de fósforo. As menores médias tanto para o florescimento feminino quanto para o masculino foram observadas para o ambiente com 0% de saturação, o que sugeriu que a toxidez ao Al influenciou no tempo de florescimento.

Para altura de plantas (AP), foi observada uma variação significativa pelo teste F ($p < 0,01$) entre as linhagens e entre os ambientes, mas não houve diferença significativa para interação linhagens por ambientes. Foi observado que as médias obtidas para os ambientes com 20% e 40% de saturação por Al foram menores em relação às médias obtidas para o ambiente de 0%, evidenciando um menor desenvolvimento vegetativo das linhagens quando submetidas ao estresse por Al.

Para produtividade de grãos foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) para as fontes de variação linhagens e ambientes (Tabela 1). Infere-se, portanto que houve variabilidade entre as linhagens, o que é imprescindível para trabalhos desta natureza, e, entre os ambientes. Em média, as linhagens apresentaram menor produtividade de grãos quando cultivadas em ambiente de 40% de saturação por Al, já os ambientes de 0% e 20% não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 1). Aparentemente, o estresse de 20% de saturação por Al não foi suficiente para causar redução na produtividade de grãos das linhagens. Esta falta de variação nas faixas de 0% e 20% pode ter acontecido por esta

faixa de 20% de saturação ainda não ter uma concentração Al^{3+} suficiente para causar uma elevada toxidez ao ponto de comprometer significativamente a produção de grãos. Adicionalmente, esse efeito pode ainda ter sido minimizado uma vez que o experimento recebeu suplementação hídrica durante todo o ciclo da cultura. Assim, mesmo com o comprometimento no desenvolvimento radicular, pelo menos não houve limitação hídrica, que em condições de cultivo em sequeiro pode ser crítico para a produtividade das culturas.

Não houve diferença significativa para interação entre linhagens e ambientes, indicando que não houve mudança na classificação do desempenho produtivo das linhagens nos diferentes ambientes. É comum na literatura o relato da existência de interação genótipos por ambientes quando avaliados em ambientes com e sem estresse abiótico (Parentoni et al., 2011; Mendes et al., 2012). Segundo Basinger et al. (2000), quando se observa uma redução inferior a 40% no potencial produtivo do milho, quando cultivado em condição de estresse observa-se que a correlação entre os materiais genéticos com e sem estresse tende a ser alta, ou seja, ausência de interação genótipos por ambiente.

Tabela 1: Análises de variância conjunta para as linhagens avaliadas em diferentes níveis de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FM	FF	AP	PG
R(A)	9	3,71	3,96	171,23	99198,60
Ambiente (A)	2	39,81**	59,52**	1043,91**	504753,40**
Linhagem (L)	3	192,74**	275,47**	6024,71**	6534673,56**
AxL	6	4,78**	5,72 ^{NS}	105,72 ^{NS}	221531,53 ^{NS}
Resíduo	27	1,70	2,94	89,61	102016,76
CV		1,99	2,49	5,78	13,47
Medias 0% Al		63,68 b	66,81 b	173,02 a	2544,19 a
Medias 20% de Al		66,75 a	70,38 a	158,23 b	2380,50 a
Medias 40% de Al		65,88 a	69,88 a	159,99 b	2189,31 b

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

^{NS}, ** não significativo e significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente;

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de t a 5% de probabilidade.

A linhagem NIL05 apresentou produtividade de grãos semelhante à linhagem semi-isogênica sensível L53 na faixa com 0% de saturação de Al, enquanto que a linhagem NIL13 apresentou superioridade em relação à L53, pelo teste de t a 5% de probabilidade (Figura 1). Já nas saturações de 20 e 40% de Al, a linhagem L53 apresentou uma queda significativa na produtividade em relação às duas NILs introgridas com o *qALT6* (Figura

1). Considerando o ambiente de 0% de saturação de Al como controle, as linhagens NIL05 e NIL13 apresentaram uma redução na produção de grãos de 4,2% e 8,7%, respectivamente, quando cultivadas no ambiente de 40% de Al. Enquanto que a L53, reduziu em 40,6% a sua produção sob estresse de 40% de saturação de Al, indicando que a sensibilidade ao Al na L53 foi associada com a queda de produtividade em solo com alta saturação de Al. Como as NILs apresentam similaridade de 96% com a linhagem L53 e possuem o *qALT6* derivado do Cateto Al237, pode se inferir que a maior estabilidade de produção das NILs nos ambientes com estresse de Al foi devida à presença deste QTL de tolerância ao Al, confirmando a importância da tolerância ao Al na produção de grãos em solos ácidos.

O parental tolerante, Cateto Al237, doador do *qALT6*, embora tenha uma produtividade muito inferior às demais linhagens avaliadas, apresentou uma variação muito pequena na produtividade de grãos entre as três faixas de saturação de Al (Figura 1). A linhagem Cateto Al237 é uma linhagem antiga derivada de variedades crioulas coletadas em áreas com elevada saturação de Al e acidez no Brasil, sendo uma boa fonte de tolerância ao Al, mas com uso limitado “per se” em programas de melhoramento devido ao seu baixo desempenho agrônômico.

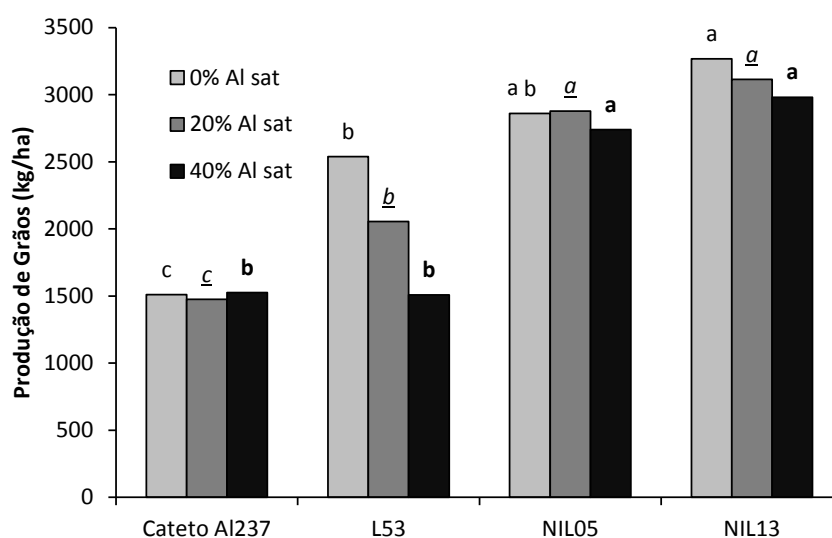


Figura 1: Produtividade de grãos das NILs introgridas com ALT6 e seus parentais avaliadas em ambientes de 0%, 20% e 40% de saturação por Al no solo. As médias seguidas pela mesma letra de padrão similar não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ($p < 0.05$).

3.2. Efeito do *qALT6* em híbridos semi-isogênicos

As análises de variâncias conjuntas para os híbridos referentes às características florescimento masculino (FM), florescimento feminino (FF), altura de plantas (AP) e produtividade de grãos (PG) para os ambientes com 0% e 40% de saturação de Al estão apresentadas na tabela 2. Foram observadas estimativas de coeficiente de variação experimental de baixa magnitude para todas as características, conforme observado para as linhagens (Tabela 2).

Para a fonte de variação híbridos, diferenças significativas foram observadas pelo teste de F ($p < 0,01$) para todas as características, indicando a existência de variabilidade entre os híbridos. Observou-se, também, diferença significativa entre os ambientes, indicando que houve efeito do estresse por saturação de Al no desempenho dos híbridos. Em média, os híbridos apresentaram florescimento mais tardio e menor desenvolvimento vegetativo quando submetidos ao estresse (Tabela 2) à semelhança do que ocorreu com as linhagens.

Observou-se redução média de 17,4% na produtividade de grãos, tendo o ambiente sem estresse como referência. Segundo Basinger et al. (2000), quando se observa redução na produtividade de grãos menor que 40%, em relação ao ambiente sem estresse, a interação genótipos por ambientes tende a não ser significativa, como ocorreu no presente trabalho (Tabela 2), indicando um desempenho dos híbridos similar entre os dois ambientes. No entanto, a diferença significativa entre os dois ambientes para a produção de grãos evidencia que a maior concentração de Al^{3+} no solo prejudicou a produtividade nestes híbridos. Lima et al. (1995) com base em cruzamentos dialélicos, obtiveram uma produção de 7880 kg.ha⁻¹ e um coeficiente de variação de 11,55, valores próximos aos obtidos no presente trabalho.

Tabela 2: Análises de variância conjunta para os híbridos avaliados em ambientes com 0% e 40% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FM	FF	AP	PG
Rep/Amb	4	3.56	15.66	1469.98	3419143.3
Ambiente (A)	1	53.44**	213.76**	23701.44**	58118531.4**
Híbridos (H)	13	2.94**	1.73 ^{NS}	938.78**	10374564.0**
A x H	13	1.08 ^{NS}	2.42 ^{NS}	80.75 ^{NS}	1626061.4 ^{NS}
Resíduo	52	1.26	2.68	72.03	893925.5
CV		1.81	2.58	3.99	10.81
Medias 0% de Al		61.45 b	61.79 b	229.35 a	9575.26 a
Medias 40% de Al		63.05 a	64.98 a	195.76 b	7911.67 b

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

^{NS}, ^{**} não significativo e significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste F.

No geral, todos os híbridos apresentaram redução na produtividade de grãos sob 40% de saturação de Al em comparação com o solo corrigido, exceto para o cruzamento entre L3 e a NIL05 (Figura 2), que coincide com o comportamento da L3, que não sofreu diferença significativa na produção entre os três ambientes (Figura 1). Na condição controle, não houve uma influência constante do *qALT6* em todos os cruzamentos genéticos. Para os cruzamentos utilizando duas linhagens elites (L228-3 e L262841) não houve diferença significativa entre o cruzamento com a L53 ou as NILs, já um cruzamento L3xNIL13 houve um ganho na produção de grãos em comparação com L3xL53, enquanto que os cruzamentos das linhagens semi-isogênicas com a 521529 apresentaram desempenho inferior ao cruzamento com a L53.

Já sob 40% de saturação de Al, houve um ganho significativo na produção de grãos quando as NILs foram utilizadas nos cruzamentos em comparação com a L53, para a maioria dos híbridos, exceto para a 521529. Uma hipótese para a não influência do *qALT6* no cruzamento com a linhagem 521529 pode ser que, como essa linhagem é muito sensível, apenas o *qALT6* não tenha sido suficiente para causar um efeito positivo na produção de grãos sob 40% de saturação. No entanto, na maioria dos cruzamentos, o *qALT6* apresentou um efeito positivo na produção de grãos sob altos níveis de saturação de Al.

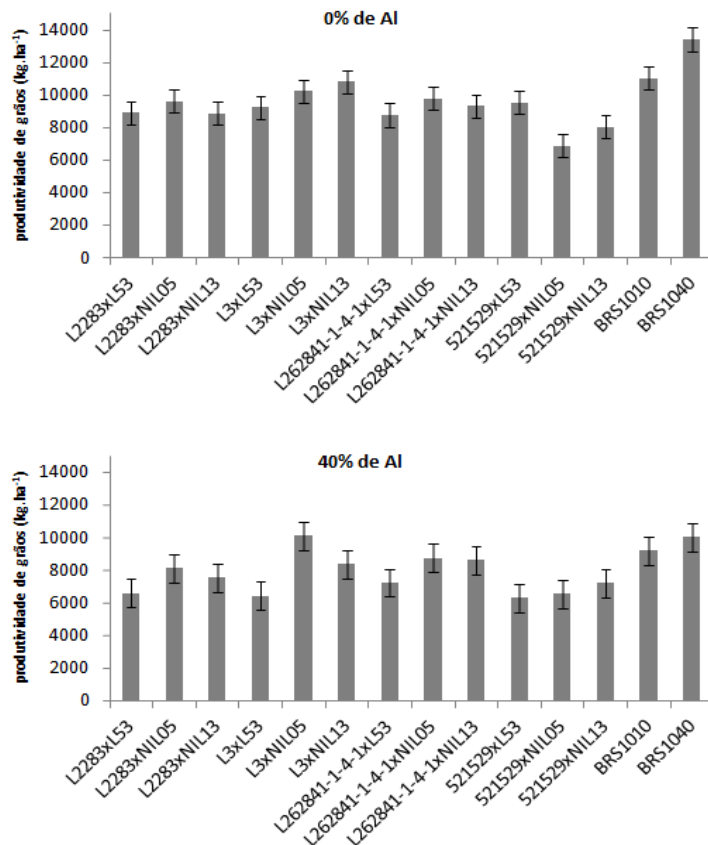


Figura 2: Médias de produtividade de grãos das 14 híbridos avaliados em ambientes de 0% e 40% de saturação por Al no solo. As barras são referentes à diferença significativa fornecida pelo teste de t a 5% de probabilidade.

4. Conclusão

A introgressão do *qALT6* que confere tolerância ao Al em solução nutritiva conferiu um aumento na produtividade de grãos nas linhagens semi-isogênicas em solo contendo 20 e 40 % de saturação de Al. Adicionalmente, o *qALT6* aumentou a produção de grãos em combinações híbridas com diferentes linhagens elites, em solo contendo alta saturação de Al, indicando uma maior estabilidade de produção em solos ácidos. Apesar de não ter havido um ganho significativo na produção de grãos no solo corrigido, em algumas combinações híbridas houve uma tendência ao efeito positivo do *qALT6*, exceto para o cruzamento com a linhagem 521529, que apresentou uma queda significativa de produção nos híbridos semi-isogênicos. O experimento deve ser repetido em outros ambientes para avaliar a estabilidade da produção desses genótipos, confirmando o efeito do *qALT6* na produção de grãos em milho.

5. Referências Bibliográficas

BÄNSINGER, M. et al. (2000). Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice. Mexico: CIMMYT, 2000. 69 p.

Conceição LDHCS, Tessele C, Basrbosa Neto JF. (2009). Diallel analysis and mapping of aluminum tolerance in corn inbred lines. *Maydica* 54: 55-61.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q *et al.* (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6, e19379.

Krill AM, Kirst M, Kochian LV, Buckler ES, Hoekenga OA: (2010). Association and linkage analysis of aluminum tolerance genes in maize. *Plos One*, 5: 1-11.

Ligaba A, MaronL, Shaff J, Kochian L, Piñeros M: (2012). Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ*, in press.

Lu Y, Zhang S, Shah T, Xie C, Hoa Z, et al. (2010). Joint linkage–linkage disequilibrium mapping is a powerful approach to detecting quantitative trait loci underlying drought tolerance in maize. *PNAS* 107. 45: 19585–19590.

Lima M, Miranda Filho JB, Furlani PR. (1995). Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. *Brazilian Journal of Genetics*, 4:579-584.

Magalhaes JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang Y, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV.. (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*. 39, 1156-1161.

Magnavaca R, Gardner CO, Clark RB (1987) Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: HW Gabelman, BC Loughman, eds, *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, pp 201-212.

Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman JK, et al. (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* 61: 728-740.

Mendes FF, Guimarães LJM, Souza JC, Guimarães PEO, et al. (2012). Adaptability and stability of maize varieties using mixed model methodology. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 111-117.

Ninamango-Cardenas F, Guimarães CT, Martins P, Parentoni SN, Carneiro NP, et al. (2003) Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica* 130: 223–232.

Pandey S, Magnavaca R, Bahia Filho AFC, Dugue-Vargues J, Vinasco LE. (1994). Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. *Crop Science*, 34:1511-1514.

Parentoni, S. N.; Mendes, F. F.; Guimarães, L. J. M. (2011). Melhoramento para eficiência no uso de P. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 250-255.

Sibov ST, Gaspar MJ, Ottoboni LMM, Arruda P, Souza AP. (1999). Two genes controlling aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome*, 42:475-482.

Simões CC. (2012). Abordagens genético-genômicas para identificação e validação de QTLs de tolerância ao alumínio em milho. 54f. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais.

Anexos

Tabela A1: Análises de variância para as linhagens avaliadas em 0% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FM	FF	AP	PG
Repetição	3	0,56	0,06	53,37	16177,23
Linhagem	3	47,73**	100,40**	2250,59**	2257549,06**
Resíduo	9	0,95	1,45	53,72	87098,40
Média		63,68	66,81	173,02	2544,19
CV		1,53	1,80	4,24	11,60

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente;

Tabela A2: Análises de variância para as linhagens avaliadas em 20% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FF	FM	AP	PG
Repetição	3	10,17	11,42	315,37	256433,0
Tratamento	3	107,17**	119,75**	1218,62**	2277659,83**
Resíduo	9	3,44	3,58	161,11	108364,39
Média		66,75	70,38	158,23	2380,5
CV		2,78	2,69	8,02	13,83

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente;

Tabela A3: Análises de variância para as linhagens avaliadas em 40% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FF	FM	AP	PG
Repetição	3	0,42	0,42	144,91	24985,56
Tratamento	3	47,42**	66,75**	2766,94**	2442527,73**
Resíduo	9	0,69	3,81	54,02	110587,51
Média		65,88	69,88	159,99	2189,31
CV		1,26	2,79	4,59	15,19

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

Tabela A4: Análises de variância para os híbridos avaliados em ambientes com 0% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FF	FM	AP	PG
Repetição	2	0,76	0,11	409,18	1080252,04
Tratamento	20	1,88 ^{NS}	2,80 ^{**}	357,73 ^{**}	3729477,92 ^{**}
Resíduo	22	1,38	0,94	31,69	769093,70
Média		61,81	61,37	233,84	9582,28
CV		1,90	1,58	2,41	9,15

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

^{NS}, ^{**} não significativo e significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.

Tabela A5: Análises de variância para os híbridos avaliados em ambientes com 40% de saturação de Al.

Fonte de Variação	Quadrados Médios				
	GL	FF	FM	AP	PG
Bloco (Repetição)	18	4,30	1,10	115,21	1381328,21
Repetição	2	41,57	0,11	3278,41	8919589,09
Tratamento	20	3,99 ^{NS}	2,80 ^{**}	252,54 ^{**}	2289370,25 [*]
Resíduo	22	1,98	0,94	46,25	1093005,50
Média		65,14	61,37	199,39	8053,00
CV		2,16	1,58	3,41	12,98

FM: florescimento masculino; FF: florescimento feminino; AP: altura de plantas; PG: produtividade de grãos;

^{NS}, ^{**} não significativo e significativo a 1% de probabilidade, pelo teste F, respectivamente.