

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

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

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

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

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

Introdução

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

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

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

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

Material e Métodos

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

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

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

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

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

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

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

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

Resultados e Discussão

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

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

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

Literatura Citada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

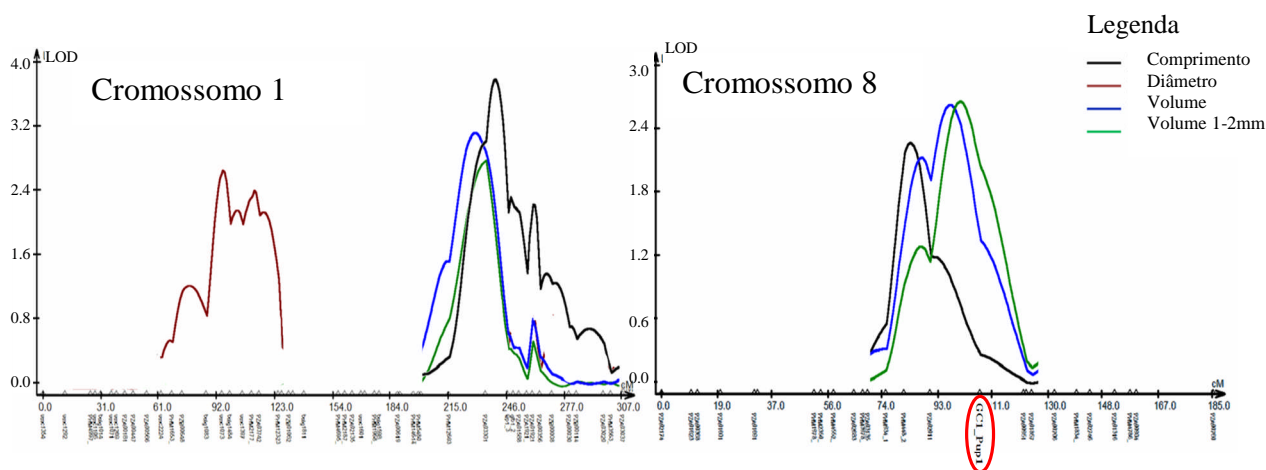
VON UEXKULL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impacts of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, p. 1-15, 1995.

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

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

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

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



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

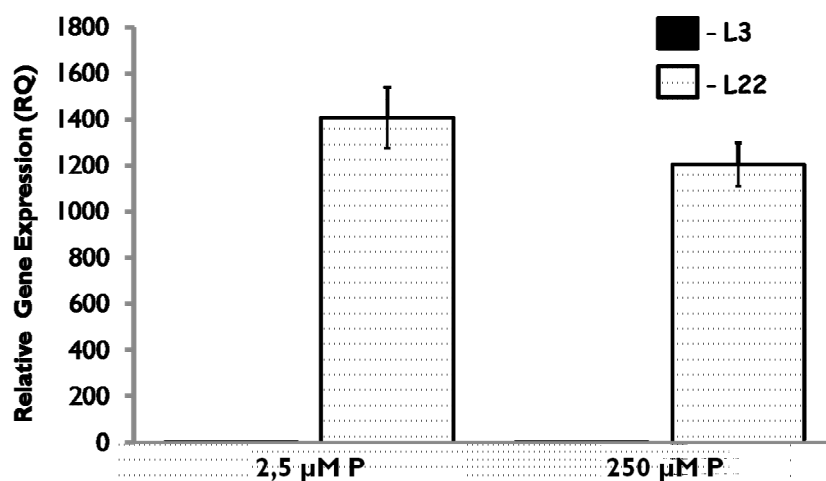


Figura 2. Expressão do gene candidato GRMZM2G451147 nas raízes crescidas sob baixo (2,5 μM) e alto (250 μM) P.

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

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

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

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

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

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