

Universidade Federal de São João del-Rei
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

RAYANNE PEREIRA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE ALÉLICA DO GENE *ZmMATE1* ASSOCIADA COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM UM PAINEL DE LINHAGENS TROPICAIS DE
MILHO**

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
MARÇO DE 2019

RAYANNE PEREIRA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE ALÉLICA DO GENE *ZmMATE1* ASSOCIADA COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM UM PAINEL DE LINHAGENS TROPICAIS DE
MILHO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “Magister Scientiae” (MS).

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
MARÇO DE 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48v Oliveira, Rayanne Pereira de .
Variabilidade alélica do gene ZmMATE1 associada
com a tolerância ao alumínio em um painel de linhagens
tropicais de milho / Rayanne Pereira de Oliveira ;
orientadora Cláudia Teixeira Guimarães. -- São João
del-Rei, 2019.
53 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João
del-Rei, 2019.


1. Milho . 2. Tolerância ao Al. 3. ZmMATE1 . 4.
Variabilidade alélica. I. Teixeira Guimarães,
Cláudia, orient. II. Título.

RAYANNE PEREIRA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE ALÉLICA DO GENE *ZmMATE1* ASSOCIADA COM A
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM UM PAINEL DE LINHAGENS TROPICAIS DE
MILHO**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del-Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de "Magister Scientiae" (MS).

Aprovada: 28 de março de 2019



Dr. Jurandir Vieira de Magalhães
EMBRAPA



Dr. Wagner Luiz Araújo
UFV



Dr.ª. Claudia Teixeira Guimarães
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Ailton (in memoriam) e Marlene e ao meu irmão Ariel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a Nossa Senhora da Conceição Aparecida, por me darem forças para seguir e não desistir nos momentos de dificuldade e ao amparo e proteção em minha vida.

A minha mãe Marlene, exemplo de força e amor, que me encorajou a seguir em frente e me apoiou nos momentos mais difíceis; ao meu pai querido Ailton (*in memoriam*), sei que olha por mim. Ao meu irmão Ariel, pelo incentivo.

A minha Orientadora, Dra. Claudia Teixeira Guimarães, pelo incentivo, atenção, apoio, paciência e pelos ensinamentos.

A Dra. Andréa Carneiro pelo auxílio e ensinamentos.

Aos analistas e técnicos do Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Célio, Ubiraci, Meire e especialmente à Beatriz, Marcos e ao Miguel Reis, pela ajuda, atenção e pelos ensinamentos. À Gislene por todo auxílio, atenção e suporte nos experimentos desenvolvidos na câmara de crescimento.

Aos funcionários, estagiários e bolsistas da Embrapa Milho e Sorgo, pela amizade, carinho e incentivo. Agradeço em especial à Ana Luiza, Arthur, Bárbara Negri, Camila Moreira, Chainheny, Fabiane, Giovana, Gleyce, Karine, Laiane, Leandro, Rafaela, Raquel, Simara e as estagiárias de férias, Camila Angélica, Janice e Marcelle pelo auxílio e contribuições de todos.

À Embrapa Milho e Sorgo por possibilitar o desenvolvimento de minha dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Fapemig e ao CNPq pelos auxílios financeiros ao projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

Oliveira, Rayanne Pereira (MS), Universidade Federal de São João del-Rei, Março de 2019. **Variabilidade alélica do gene *ZmMATE1* associada com a tolerância ao alumínio em um painel de linhagens tropicais de milho.** Orientadora: Claudia Teixeira Guimarães.

RESUMO

A toxidez por alumínio (Al) é um fator limitante para a produção agrícola em solos ácidos, que estão presentes em aproximadamente 50% das áreas agricultáveis do mundo. A tolerância ao Al é uma característica complexa em milho (*Zea mays* L.), onde até o momento, apenas o *ZmMATE1* foi caracterizado como o gene responsável por parte dessa tolerância, via exsudação de citrato nos ápices radiculares. A forma alélica do gene *ZmMATE1*, que confere tolerância ao Al, está organizada em três cópias em tandem e foi associada com os altos níveis de expressão do gene na linhagem Cateto Al237. Já o alelo presente na linhagem L53, altamente sensível ao Al, está organizado em uma única cópia, associado à baixa expressão do gene *ZmMATE1*. Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) localizado na região promotora do gene *ZmMATE1* foi compartilhado com um grupo restrito de linhagens que possuíam alta expressão do gene, sendo uma evidência inicial da associação entre o polimorfismo e a expressão do gene. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar a frequência e a distribuição das três cópias e do SNP na região promotora do *ZmMATE1* em um painel de ampla diversidade de milho tropical, visando consolidar as inferências sobre o efeito desses polimorfismos na expressão do *ZmMATE1* e na tolerância ao Al. O painel foi constituído por 60 linhagens de milho, selecionadas a partir de 363 linhagens da Embrapa e 21 do CIMMYT (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo), que foram caracterizadas quanto ao número de cópias, ao SNP na região promotora e à expressão do gene *ZmMATE1*, além da tolerância ao Al em solução nutritiva. Três novas linhagens contendo o gene *ZmMATE1* em triplicata foram identificadas no painel, sendo duas originárias do Brasil e uma da Colômbia. Todas as linhagens com três cópias do *ZmMATE1* apresentaram alelo T, alta expressão do gene e tolerância ao Al de alta a intermediária. O alelo T foi associado ao aumento no nível de expressão do gene *ZmMATE1*, tendo sua origem provável no Composto Tuxpeño e no grupo filogenético compartilhado com as linhagens derivadas da raça Cateto. Duas linhagens altamente tolerantes ao Al não

apresentaram o alelo superior do *ZmMATE1*, confirmando a existência de diferentes mecanismos de tolerância ao AI em milho. Assim, a ampla variabilidade genética e fenotípica apresentada no painel de linhagens tropicais de milho permitiu identificar novas combinações de alelos conferindo alta expressão do gene *ZmMATE1*, além de novos genes, que poderão ser piramidados visando o desenvolvimento de cultivares com níveis superiores de tolerância ao AI.

Palavras-chaves: Milho; tolerância ao AI; *ZmMATE1*; variabilidade alélica.

Oliveira, Rayanne Pereira (MS), Universidade Federal de São João del-Rei, Março de 2019. **Allelic variability of the *ZmMATE1* gene associated with aluminum tolerance in a panel of tropical maize lines.** Orientadora: Claudia Teixeira Guimarães.

ABSTRACT

Aluminum (Al) toxicity is a limiting factor for crop yield on acid soils, which covers approximately 50% of the world arable lands. Al tolerance is a complex trait in maize (*Zea mays* L.), where until now, only the *ZmMATE1* was characterized as a gene responsible for part of this tolerance, via citrate exudation in root apices. The allelic form of the *ZmMATE1* gene that confers Al tolerance is organized in three tandem copies and was associated with the high levels of gene expression in Cateto Al237. The allele present in the line L53, highly sensitive to Al, is organized in a single copy and was associated with low expression of *ZmMATE1*. A single nucleotide polymorphism (SNP) located in the promoter region of the *ZmMATE1* gene was shared with a small group of lines with high expression of this gene, being a first evidence of the association between this polymorphism and gene expression. Thus, the objective of this study was to investigate the frequency and distribution of the three copies and the SNP in the promoter region of *ZmMATE1* in a tropical maize panel of wide diversity, aiming to consolidate the inferences about the effect of these polymorphisms in the expression of *ZmMATE1* and in the Al tolerance. The panel was composed of 60 maize inbred lines, selected from 363 lines of Embrapa and 21 of CIMMYT (International Center for Improvement of Maize and Wheat), which were characterized for the copy number variation, the SNP in the promoter region and the gene expression of *ZmMATE1*, in addition to the Al tolerance in nutrient solution. Three new lines containing the *ZmMATE1* gene in triplicate were identified in the panel, of which two were from Brazil and one from Colombia. All maize lines with three copies of *ZmMATE1* showed the T allele, high gene expression and tolerance to Al from high to intermediate. The T allele was associated with an increase in the expression level of the *ZmMATE1* gene, which was originated probably in the Composto Tuxpeño and in the phylogenetic group shared with the lines derived from Cateto landrace. Two lines highly Al tolerant did not have the superior allele of *ZmMATE1*, confirming the existence of different Al tolerance mechanisms in maize. Thus, the wide genetic and

phenotypic variability within the tropical maize panel allowed the identification of new combinations of alleles conferring high expression of *ZmMATE1*, in addition to new genes, which may be pyramided to develop cultivars with superior levels of AI tolerance.

Keywords: Maize; AI tolerance; *ZmMATE1*; Allelic variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição de elementos *cis* regulatórios ao longo de 2710 pb da região promotora do gene *ZmMATE1* da linhagem L53. Na posição -2499, indicada pelo asterisco, está representado o SNP T/C, que corresponde ao código Y. Em **A** está representada a sequência de ligação para fatores NAC flanqueando esse SNP. Em **B** encontra-se o motivo de ligação de proteínas MYB no alelo C da L53. Letras maiúsculas dentro do motivo de ligação representam a sequência *core*, definida como a mais conservada. Letras em vermelho são as posições conservadas e de alto conteúdo informativo na região. Adaptado de Costa *et al.* (2017)10

Figura 2- Árvore filogenética incluindo as 363 linhagens de milho da Embrapa genotipadas com base em 12.700 marcadores SNPs. Algumas linhagens realçadas em amarelo foram selecionadas por apresentarem o SNP T e outras pela formação de grupos filogenéticos, que foram indicados de G1 a G7. Adaptado de Ribeiro (2015)17

Figura 3- Estimativa do número de cópias (CNV) do gene *ZmMATE1* baseada em PCR quantitativo em um sub-grupo de linhagens da Embrapa e do CIMMYT20

Figura 4- Expressão relativa do gene *ZmMATE1* no ápice radicular após 6 horas de tratamento com Al em 60 linhagens tropicais de milho. Linhagens identificadas com as mesmas letras fazem parte de grupos homogêneos de expressão relativa do gene *ZmMATE1* pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os números de 1 a 60 no eixo x representam as linhagens do painel conforme descritas na Tabela 3. Entre parênteses está a descrição do número de cópias 1/3 e o polimorfismo T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.....22

Figura 5- Tolerância ao alumínio em linhagens de milho da Embrapa Milho e Sorgo e do CIMMYT avaliada com base no crescimento relativo da raiz (CRR) em solução nutritiva. Linhagens identificadas com as mesmas letras fazem parte de grupos homogêneos de CRR pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os números de 1 a 60 no eixo x representam as linhagens do painel conforme descritas na Tabela 3.

Entre parênteses está a descrição do número de cópias 1/3 e o polimorfismo T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.....23

Figura 6- Correlação entre a expressão relativa do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao Al avaliada com base no crescimento relativo da raiz seminal (CRR) em um painel de 57 linhagens tropicais de milho.24

Figura 7- Boxplot da expressão relativa do gene *ZmMATE1* e da tolerância ao alumínio medida em CRR no painel de linhagens de milho classificadas quanto ao polimorfismo (C/T) e ao número de cópias (3/1) do gene *ZmMATE1*25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências de primers para quantificar o número de cópias do gene *ZmMATE1*, sendo o gene da actina utilizado como controle de gene cópia única... 14

Tabela 2- Linhagens de milho do CIMMYT, Colômbia descritas como tolerante ou sensível ao alumínio e genotipadas quanto ao SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*. Em negrito estão as linhagens selecionadas para o presente trabalho.. 16

Tabela 3- Linhagens de milho da Embrapa e do CIMMYT, incluindo informações de origem, grupo heterótico, agrupamento filogenético com base da Figura 1 e SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1* 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Al ou Al³⁺	Alumínio
ALMT 1	<i>Aluminum-Activated Malate Transporter</i>
Alts_B	Loco de tolerância ao Al em sorgo
ART1	<i>Al resistance transcription factor 1</i>
ASR	<i>Abscisic Acid, Stress and Ripening</i>
ALS1	<i>Aluminum Sensitive 1</i>
AtMATE	<i>Arabidopsis thaliana MATE</i>
AtSTOP1	<i>Arabidopsis thaliana STOP1</i>
CF	Crescimento final
CI	Crescimento inicial
CIMMYT	Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo
CLR	Crescimento líquido de raiz
CNV	<i>Copy number variation</i>
CRR	Crescimento Relativo de Raiz
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> (Brometo de Cetil Trimetilamônio)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetraacético)
GBS	<i>Genotyping-by-Sequencing</i> (Genotipagem por sequenciamento)
KASP	<i>Kompetitive Allele-Specific PCR</i>
HvAACT1	<i>Hordeum vulgare</i> aluminum-activated citrate transporter
MATE	<i>Multidrug and toxic compound exudation</i>
NAC	No apical meristem (NAM), <i>Arabidopsis</i> transcription activation fator (ATAF), Cup-shaped cotyledon (CUC)
NaCl	Cloreto de Sódio
Nramp	<i>Natural Resistance-associated Macrophage Protein</i>
Nrat1	<i>Nramp aluminum transporter 1</i>
OsART1	<i>Oryza sativa</i> ART1

pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
qPCR	<i>Quantitative polimerase chain reaction</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i> (loci de herança quantitativa)
<i>SbMATE</i>	<i>Sorghum bicolor</i> MATE
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
<i>STAR1</i>	<i>Sensitive to Al rhizotoxicity 1</i>
<i>STOP1</i>	<i>Sensitive to Proton Rhizotoxicity 1</i>
<i>TaALMT1</i>	<i>Triticum aestivum</i> ALMT
<i>ZmMATE1</i>	<i>Zea mays</i> MATE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. O ALUMÍNIO E OS SOLOS ÁCIDOS	4
3.2. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO AL.....	5
3.3. GENES RELACIONADOS COM A TOLERÂNCIA AO AL EM PLANTAS	5
3.4. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA AO AL.....	7
3.5. GENÉTICA DA TOLERÂNCIA AO AL EM MILHO.....	8
4. METODOLOGIA	11
4.1. MATERIAL GENÉTICO	11
4.2. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO DNA	11
4.3. GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ZmMATE1</i>	11
4.4. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO AL TÓXICO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA ...	12
4.5. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>ZmMATE1</i>	13
4.6. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>ZmMATE1</i>	14
5. RESULTADOS	15
5.1. LINHAGENS DE MILHO SELECIONADAS QUANTO AO SNP NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ZmMATE1</i> E AO AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO	15
5.2. VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>ZmMATE1</i>	18
5.3. EXPRESSÃO DO GENE <i>ZmMATE1</i> E TOLERÂNCIA AO AL NO PAINEL DE LINHAGENS TROPICAIS DE MILHO	20
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Os solos ácidos correspondem a aproximadamente 50% das terras cultiváveis de todo o planeta, sendo amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais (Von Uexküll & Mutert, 1995). No Brasil, cerca de 205 milhões de hectares são compostos por solos ácidos (Olmos & Camargo, 1976), incluindo o Cerrado brasileiro, amplamente utilizado nas atividades agrícolas (Fageria *et al.* 1999). Devido a esta acidez, o alumínio é encontrado no solo na forma trivalente (Al^{3+}) (Kochian, 1995), altamente tóxica e facilmente absorvida pelas plantas, inibindo o desenvolvimento radicular e reduzindo a exploração de camadas mais profundas do solo (Panda *et al.* 2009).

Em milho (*Zea mays* L.), a tolerância ao Al é uma característica complexa (Magnavaca *et al.* 1987), envolvendo diversos genes e mecanismos fisiológicos (Pandey *et al.* 1994). A partir de estudos de mapeamento de *locos* de herança quantitativa (QTLs, do inglês *Quantitative Trait Loci*), uma região genômica localizada no cromossomo 6 foi associada com a tolerância ao Al, explicando em torno de 15% da característica em populações biparentais de milho (Sibov *et al.* 1999; Ninamango *et al.* 2003). Essa região genômica foi co-localizada com o gene *ZmMATE1*, que codifica um transportador da família *multi-drug and compound extrusion*, responsável pela exsudação de citrato no ápice radicular de linhagens tolerantes ao Al (Maron *et al.* 2010). Um estudo genético indicou que presença de três cópias em tandem do gene *ZmMATE1* foi associada com a alta expressão do gene e com a maior tolerância ao Al na linhagem Cateto Al237 (Maron *et al.* 2013). Posteriormente, um pequeno conjunto de linhagens derivadas da L228-3 apresentou níveis de expressão do *ZmMATE1* compatíveis com Cateto Al237 e apenas uma cópia do gene (Guimaraes *et al.* 2014), sugerindo a existência de outro mecanismo de controle da expressão do *ZmMATE1*, além do número de cópias descrito previamente em Cateto Al237 (Maron *et al.* 2013). Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) localizado na região promotora do *ZmMATE1* foi compartilhado pelas linhagens que apresentam alta expressão do gene (Cateto Al237 e a L228-3) em comparação com linhagens com baixa expressão do gene (Barros *et al.* 2016; Costa, 2017).

Esses estudos indicam a existência de dois polimorfismos potencialmente associados com a expressão do gene *ZmMATE1*, as três cópias e o SNP na região promotora do gene alvo. No entanto, essas evidências foram baseadas em um pequeno grupo de linhagens, cuja ampliação pode facilitar a exploração da variabilidade genética e consolidar o efeito desses polimorfismos na tolerância ao AI em milho.

2. OBJETIVO

Caracterizar a variabilidade alélica de dois polimorfismos no gene *ZmMATE1*, o número de cópias e o SNP na região promotora, e sua possível associação com a tolerância ao AI em um painel de linhagens tropicais de milho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O ALUMÍNIO E OS SOLOS ÁCIDOS

O alumínio (Al) é o elemento químico mais abundante no solo, ocupando o terceiro lugar entre os elementos presentes na crosta terrestre, após o oxigênio e o silício (Pournourmohammadi *et al.* 2008). A disponibilidade do Al na solução do solo depende do pH, cujos valores ≤ 5 favorecem a formação dos íons Al^{3+} , forma tóxica e facilmente absorvida pelas plantas. O ápice radicular é o principal tecido afetado pelo Al tóxico, cujos efeitos têm início em segundos, começando com a inibição da alongação das raízes (Kochian *et al.* 2004), tornando-as grossas, com raízes laterais e ápices espessos, curtos, escuros e sem ramificações (Foy *et al.* 1978). Ocorre também a redução do tamanho da coifa e o desarranjo do tecido meristemático (Peixoto *et al.* 2007). Assim, os danos causados nas raízes limitam a absorção de nutrientes e de água (Degenhardt *et al.* 1998), culminando na redução do seu desenvolvimento vegetativo (Ryan *et al.* 1993; Jones & Kochian, 1995).

Os solos ácidos estão presentes em aproximadamente 50% das terras agricultáveis do mundo (Von Uexküll & Mutert, 1995) e ocupam 205 milhões de hectares no Brasil, dos quais 112 milhões são considerados aptos para a agricultura (Olmos & Camargo, 1976). A acidificação do solo ocorre por processos naturais, como a lavagem e a lixiviação dos nutrientes do solo (Santiago & Rossetto, 2005), pela intensificação da agricultura (Quintal *et al.* 2017), que ocasiona a remoção dos nutrientes essenciais como o cálcio, o magnésio e o potássio, sem a devida reposição, e pelo uso de fertilizantes ácidos (Santiago & Rossetto, 2005).

Práticas agronômicas como a calagem e a gessagem minimizam a toxicidade do Al, uma vez neutralizam os íons H^+ e Al^{3+} , respectivamente (Ferreira *et al.* 2006). No entanto, tais práticas elevam os custos da produção agrícola além de terem sua efetividade restrita, uma vez que a calagem é mais eficiente na correção das camadas superficiais do solo e a gessagem pode causar a lixiviação de outros nutrientes para as camadas subsuperficiais (Freitas *et al.* 2006).

3.2. MECANISMOS DE TOLERÂNCIA DAS PLANTAS AO AL

As espécies vegetais apresentam grande variabilidade fenotípica para a tolerância ao Al, envolvendo diferentes mecanismos para sobrevivência sob tal estresse (Echart & Molina, 2001). Os mecanismos de tolerância ao alumínio são classificados como os que impedem a entrada do Al^{3+} nas células radiculares (mecanismos apoplásticos) e os mecanismos de detoxificação interna do Al que penetrou nas células (mecanismos simplásticos) (Kochian, 1995; Kochian *et al.* 2004).

O principal mecanismo de tolerância e o mais bem caracterizado em mono e dicotiledôneas é o de exclusão do Al mediado pela exsudação de ácidos orgânicos (citrato, malato ou oxalato) na rizosfera (Kochian *et al.* 2015). Os ácidos orgânicos quelam os íons Al^{3+} , impedindo que eles atravessem a membrana plasmática e atinjam o simplasto (Kochian *et al.* 2015).

Outra classe de mecanismos envolve a detoxificação interna do Al (simplástico), onde o Al que penetra na célula tem sua fitotoxidez neutralizada por meio da interação com moléculas orgânicas ou é translocado para o interior do vacúolo ou para outros órgãos da planta onde o Al causa menores danos (Ryan *et al.* 2011; Miguel *et al.* 2010; Kochian *et al.* 2015). Em algumas espécies tolerantes, o Al é translocado e acumulado nas folhas, em formas não tóxicas, como o chá-da-índia (*Camelia sinensis*), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) e em hortênsia (*Hydrangea macrophylla*), onde o Al pode compor mais de 1% do peso seco da parte aérea (Delhaize *et al.* 2009). Assim, nessas espécies o Al não causa os sintomas adversos e pode até estimular o seu crescimento.

3.3. GENES RELACIONADOS COM A TOLERÂNCIA AO AL EM PLANTAS

A identificação de genes permite uma melhor compreensão dos aspectos genéticos, moleculares e fisiológicos envolvidos na tolerância ao Al, que são importantes para o desenvolvimento de cultivares tolerantes e adaptados ao cultivo em solos ácidos (Sade *et al.* 2016).

O primeiro gene de tolerância ao Al foi clonado em trigo (*Triticum aestivum*), *TaALMT1*, que codifica um transportador da família ALMT (*aluminum-activated malate transporter*), responsável pelo efluxo de malato no ápice radicular de linhagens tolerantes ativado pelo Al (Sasaki *et al.* 2004). O gene *TaALMT1* foi co-localizado em o loco (*Alt_{BH}*), responsável por controlar 85% da variação fenotípica da tolerância ao Al em trigo em uma população biparental (Riede & Anderson, 1996). Um grande número de membros da família ALMT foram implicados na exsudação de malato e na tolerância ao Al em diferentes espécies, incluindo *Arabidopsis* (*AtALMT1*; Hoekenga *et al.* 2006), colza (*BnALMT1* e *BnALMT2*; Ligaba *et al.* 2006), centeio (*ScALMT1*; Collins *et al.* 2008) e cevada (*HvALMT1*; Gruber *et al.* 2010).

Em sorgo (*Sorghum bicolor*), o loco *Alt_{SB}* explica em torno de 80% da variação fenotípica da tolerância ao Al em uma população de linhagens recombinantes (Magalhaes *et al.* 2004). Nesse loco foi identificado o gene *SbMATE* que codifica um transportador pertencente à família MATE (*multi-drug and compound extrusion*), responsável pela exsudação de citrato nos ápices das raízes de linhagens tolerantes, ativado na presença do Al (Magalhaes *et al.* 2007). Homólogos da família MATE controlando tolerância ao Al foram identificados em *Arabidopsis* (*AtMATE*; Liu *et al.* 2009), trigo (*TaMATE1*; Ryan *et al.* 2009), centeio (*ScFRDL2*; Yokosho *et al.* 2010), milho (*ZmMATE1*; Maron *et al.* 2010) e arroz (*OsFRDL4*; Yokosho *et al.* 2011).

Outros genes têm sido associados com a tolerância ao Al, além daqueles que codificam transportadores de ácidos orgânicos. Dentre eles, podemos destacar os transportadores ABC (ATP binding cassette), que são proteínas transmembrana presentes em procariotos e eucariotos (Henikoff *et al.* 1997). Esses genes foram associados com a tolerância ao Al em *Arabidopsis* (*ALS3* e *ALS1*; Larsen *et al.* 2005, 2007) e arroz (*STAR1* e *STAR2*; Huang *et al.* 2009). O gene *ALS3* está possivelmente associado ao transporte do Al via floema para regiões menos sensíveis da planta e o *ALS1* está envolvido no transporte do Al para o vacúolo (Larsen *et al.* 2007). Os genes *STAR1* e *STAR2* codificam o domínio de ligação a nucleotídeos e o domínio transmembrana de um transportador ABC, respectivamente, envolvido no transporte da UDP-glicose na parede celular, que pode estar envolvido na modificação da parede, reduzindo sua capacidade de ligação com o Al (Huang *et al.* 2009; Kochian *et al.* 2015; Sade *et al.* 2016). Outro transportador ABC do subgrupo Transportador Associado ao Antígeno em Processamento (TAP), localizado no tonoplasto das células de raiz de arroz, parece ser o responsável pelo transporte do Al do citoplasma

para o vacúolo (Huang *et al.* 2012). O gene *OsALS1*, que codifica esse transportador, é rapidamente induzido pelo Al, sendo requerido no mecanismo de detoxificação interna do Al em arroz (Huang *et al.* 2012).

O gene *Nrat1* (*Nramp aluminum transporter 1*) de arroz codifica um transportador de membrana específico para Al^{3+} (Xia *et al.* 2010). *Nrat1* é membro da família *Nramp* (*Natural Resistance-associated Macrophage Protein*) e se localiza na membrana plasmática das células do ápice radicular, excetuando-se nas epidérmicas. O transportador *Nrat1* transloca o Al^{3+} prejudicial à parede celular para dentro do citoplasma. No entanto, esse transportador, em conjunto com transportadores do tipo ABC, provavelmente atuarão de forma complementar para remover o Al da parede celular e transportá-lo para o vacúolo nas células da raiz (Xia *et al.* 2010; Huang *et al.* 2012).

Genes da família *ASR* (*ABSCISIC ACID STRESS RIPENING*), identificados inicialmente em tomate (Iusem *et al.* 1993), estão envolvidos no amadurecimento de frutos e desempenham um papel importante durante seca e salinidade em mono e dicotiledôneas (Carrari *et al.* 2004). Arenhart *et al.* (2013) demonstraram que o gene *ASR5* é regulado pelo Al em plantas de arroz tolerantes e não é responsivo em plantas sensíveis. Adicionalmente, plantas transgênicas com RNAi desse gene foram mais sensíveis ao Al, sugerindo que *ASR5* seja um fator transcricional que regula outros genes que, em conjunto, protegem as células do estresse causado pelo Al. *ASR5* também apresentou alta expressão nas raízes de genótipos de arroz tolerantes sob estresse por Al (Yang *et al.* 2007).

3.4. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA TOLERÂNCIA AO AL

A expressão dos genes das famílias *ALMT* e *MATE* é regulada pelos fatores de transcrição do tipo dedo de zinco Cys_2-His_2 , denominados *STOP1* (*Sensitive to proton rhizotoxicity 1*) e *ART1* (*Aluminium resistance transcription factor 1*) (Iuchi *et al.* 2007). Em *Arabidopsis*, a expressão dos genes *AtALMT* e *AtMATE* é mediada pelo fator de transcrição *STOP1*, que age de forma independente em ambos os genes (Iuchi *et al.* 2007).

O *ART1* é um homólogo do *STOP1*, que interage com o elemento *cis* [GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)] e regula a expressão de vários genes envolvidos na tolerância ao Al em arroz (Yamaji *et al.* 2009), como *STAR1* e *STAR2* (Huang, 2009); *Nrat1* (Xia *et al.* 2010); *OsFRDL4*, representante da família MATE em arroz (Yokosho *et al.* 2011) e *OsALS1* (Huang *et al.* 2012). Já em trigo e cevada, a expressão dos genes *TaALMT1* e *HvAACT1*, respectivamente, ocorre de forma constitutiva, e o efluxo dos ácidos orgânicos (malato e citrato) ocorre independente da exposição da raiz ao Al (Liu *et al.* 2009).

O WRKY46 é um membro da família de fatores de transcrição que atua como regulador negativo da expressão do gene *AtALMT1* (Ding *et al.* 2013). Embora a expressão de ambos os genes seja co-localizada na raiz, respostas inversas na expressão desses genes foram observadas presença do Al. A região promotora de *AtALMT1* apresenta diversos domínios WRKY putativos, alguns dos quais mostraram estar ligados com a proteína AtWRKY46, controlando negativamente a exsudação de malato (Ding *et al.* 2013).

Um exemplo interessante de alteração da função de transporte via modulação da expressão gênica é com o gene *HvAACT1*, que codifica um transportador de citrato em cevada. A função primária desse transportador é liberar citrato no xilema facilitando a translocação de ferro das raízes para a parte aérea (Fujii *et al.* 2012). No entanto, a inserção de um elemento transponível de 1 kb na região promotora aumentou a expressão desse gene e alterou sua expressão para o ápice radicular, onde o maior efluxo de citrato culminou no aumento da tolerância ao Al (Fujii *et al.* 2012).

3.5. GENÉTICA DA TOLERÂNCIA AO AL EM MILHO

Estudos de mapeamento de QTLs em milho identificaram uma região genômica consistentemente associada com tolerância ao Al no cromossomo 6 por Sibov *et al.* (1999) e Ninamango *et al.* (2003). Tal região foi, posteriormente, co-localizada com o gene *ZmMATE1*, homólogo ao *SbMATE* de sorgo e caracterizado como o primeiro gene que controla a tolerância ao Al em milho (Maron *et al.* 2010).

O gene *ZmMATE1* codifica um transportador de citrato ativado pelo AI e expresso preferencialmente no ápice radicular de linhagens tolerantes (Maron *et al.* 2010). Um estudo sobre as bases moleculares da tolerância ao AI demonstrou que o gene *ZmMATE1* está organizado em três cópias em tandem na linhagem Cateto AI237, tolerante ao AI, e que as três cópias do *ZmMATE1* conferem uma maior expressão, resultando em uma maior tolerância, quando comparado com uma única cópia do gene presente na linhagem L53 (Maron *et al.* 2013). O alelo superior do *ZmMATE1* que confere tolerância ao AI é raro em milho, estando presente em apenas três das 279 linhagens avaliadas por Maron *et al.* (2013).

Em um conjunto de 37 linhagens tropicais de milho, a linhagem L228-3 e suas derivadas se destacaram pelos altos níveis de expressão do gene *ZmMATE1*, comparáveis com a linhagem Cateto AI237, apesar de possuírem apenas uma cópia do gene *ZmMATE1* (Guimaraes *et al.* 2014). Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) localizado 2.499 pb antes do códon de início da transcrição do *ZmMATE1* foi associado com a expressão desse gene em um pequeno conjunto de linhagens (Barros *et al.* 2015; Costa, 2017). Por meio de uma análise *in silico*, foi identificado que esse SNP coincide com uma região conservada para ligação de fatores de transcrição da família MYB e flanqueia uma região de ligação de fatores de transcrição da família NAC (Costa, 2017) (Figura 1), sugerindo uma possível função desse SNP na expressão do gene alvo.

O conjunto de informações disponível indica que o efeito do gene *ZmMATE1* na tolerância ao AI é modulado pela sua expressão no ápice radicular. As três cópias em tandem do gene *ZmMATE1* é um dos mecanismos moleculares que controla a expressão desse gene na linhagem Cateto AI237, conferindo tolerância ao AI. Já o SNP na região promotora do gene precisa ser testado quanto à sua potencial influência na expressão do *ZmMATE1* e na tolerância ao AI. Como tais evidências são suportadas por um número muito pequeno de linhagens, a expansão dessas informações para um painel de ampla diversidade genética consolidará significativamente as inferências genéticas e funcionais desses polimorfismos no controle da tolerância ao AI em milho.

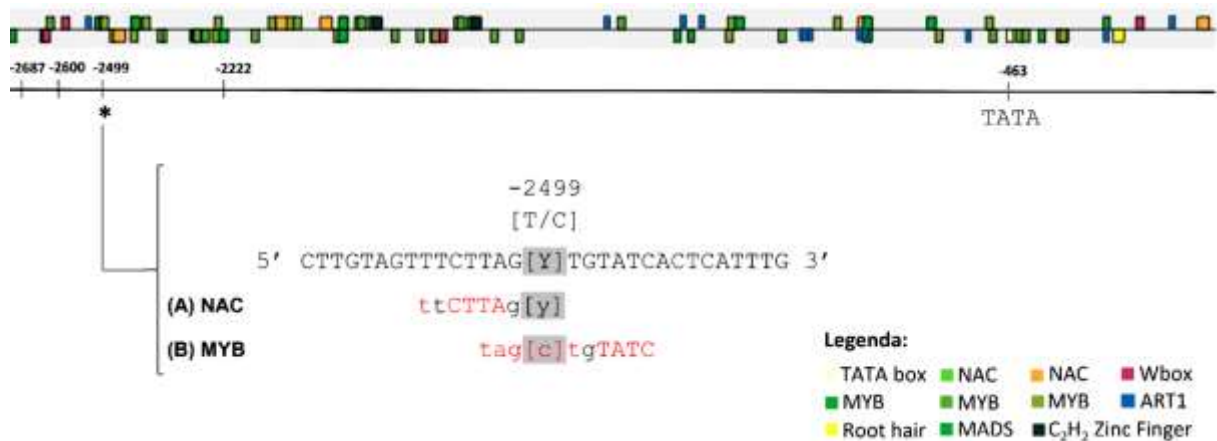


Figura 1- Distribuição de elementos *cis* regulatórios ao longo de 2710 pb da região promotora do gene *ZmMATE1* da linhagem L53. Na posição -2499, indicada pelo asterisco, está representado o SNP T/C, que corresponde ao código Y. Em **A** está representada a sequência de ligação para fatores NAC flanqueando esse SNP. Em **B** encontra-se o motivo de ligação de proteínas MYB no alelo C da L53. Letras maiúsculas dentro do motivo de ligação representam a sequência *core*, definida como a mais conservada. Letras em vermelho são as posições conservadas e de alto conteúdo informativo na região. Adaptado de Costa (2017).

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAL GENÉTICO

Um painel de 363 linhagens da Embrapa previamente avaliado por Ribeiro (2015) foi genotipado com o marcador que revela o SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*. A partir dessa informação, as linhagens que apresentaram o SNP T foram selecionadas juntamente com algumas linhagens filogeneticamente próximas, formando subgrupos com alta similaridade e ampla diversidade entre eles. As 363 linhagens foram agrupadas com base em 12.700 SNPs gerados por meio da técnica de genotipagem por sequenciamento (GBS) segundo Ribeiro (2015). Adicionalmente, o DNA de 21 linhagens do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), Colômbia foram cedidas pelo pesquisador Luiz Narro e utilizadas na genotipagem com o SNP alvo.

4.2. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO DNA

Folhas jovens de pelo menos sete plântulas, cultivadas em hidroponia, foram utilizadas para representar cada linhagem, que foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C. O DNA genômico foi extraído pelo método CTAB, descrito por Saghai-Marooif *et al.* (1984) e quantificado no NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

4.3. GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ZmMATE1*

A genotipagem foi realizada utilizando o ensaio KASP (*Kompetitive Allele-Specific PCR*), previamente convertido e validado por Barros *et al.* (2015). A reação

de amplificação foi realizada com 5 μ L de KASP Master Mix, 50 ng de DNA e 0,14 μ L de KASP Assay Mix contendo os *primers* (LGC Genomics, Teddington, Inglaterra). Os ciclos de amplificação foram 94° C por 15 minutos, seguidos por 10 ciclos a 94° C por 20 segundos, 61 °C durante 1 minuto reduzindo 0,6° C por ciclo, seguido de mais 26 ciclos de 94°C durante 20 segundos e 55°C durante 1 minuto.

A intensidade da fluorescência das amostras foi quantificada por meio do leitor de microplacas FLUOstar Omega Filter-based multi-mode microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) utilizando a fluorescência ROX na normalização do sinal. A genotipagem foi realizada utilizando o software KlusterCaller 1.1 (LGC Genomics, Teddington, Inglaterra).

4.4. AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO AL TÓXICO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento com temperatura a 27°C durante o dia e 21° C a noite com fotoperíodo de 12 h e 330 μ mol fótons $m^{-2}s^{-1}$. As linhagens foram divididas em três experimentos com duas testemunhas comuns Cateto Al237 e L53, caracterizadas como tolerante e sensível ao Al, respectivamente. Cada experimento foi realizado em delineamento de blocos casualizados com três repetições e sete plântulas por tratamento, em bandejas contendo solução nutritiva descrita por Magnavaca *et al.* (1987) com pH 4,0 e aeração constante.

As sementes foram esterilizadas em NaOCl a 5%, sob agitação de 150 rpm, por 5 minutos, enxaguadas oito vezes com água deionizada, e então colocadas para germinar em folhas de papel de germinação umedecidas. As sementes foram germinadas por 24 horas a 30°C em germinador e então mantidas por três dias na câmara de crescimento.

As plântulas uniformes e sem danos visíveis nas raízes foram colocadas em copos dosadores de polietileno de 10 mL contendo perfurações em sua base, para acomodar suas raízes. Estes copos contendo as plântulas foram colocados em placas plásticas encaixadas em bandejas de 8 L contendo solução nutritiva sem Al. Após 24 h de aclimação o comprimento inicial da raiz (CI) das plantas foi medido. Metade das plântulas foram mantidas na solução sem Al e a outra metade foi transferida para

a mesma solução contendo {39} μM de atividade de Al^{3+} suplementada com $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$. A atividade de Al^{3+} livre foi calculada com o programa de GEOCHEM-EZ (Shaff *et al.*, 2010). Após cinco dias, foi medido comprimento final da raiz (CF). O crescimento líquido da raiz (CLR) foi obtido pela diferença entre o CF e o CI de cada plântula nas soluções com e sem Al. O crescimento relativo da raiz (CRR) foi calculado pela razão entre o CLR na solução contendo Al e o CLR na solução sem Al.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada característica avaliada, e as médias foram comparadas por meio do teste Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o programa R (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria; <http://www.r-project.org>).

4.5. DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *ZmMATE1*

A variação do número de cópias (CNV, do inglês *Copy Number Variation*) foi analisada pelo método de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) de acordo com a metodologia proposta por Barros *et al.* (2011) e Maron *et al.* (2013).

A PCR foi realizada com o sistema de detecção SYBR Green no equipamento 7500 Fast-Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). A estimativa do número de cópias foi calculada utilizando a fórmula $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}^{\text{alvo}} - \text{Ct}^{\text{referência}}$, pela comparação do valor de ΔCt de amostras desconhecidas com o ΔCt de uma amostra calibradora, no caso a L53, para obtenção do $\Delta\Delta\text{Ct}$. Assim, o número de cópias é calculado aplicando-se a equação $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001), utilizada na quantificação da expressão relativa. Em cada ensaio, as amostras foram analisadas para o gene *ZmMATE1* utilizando o gene actina como padrão de cópia única. Os primers estão apresentados na Tabela 1. Três réplicas técnicas de cada amostra foram utilizadas para o cálculo das médias por ensaio e a amostra referência utilizada foi L53.

As reações de amplificação incluíram 100 ng de DNA genômico, 5 μL do reagente Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 16,6 μM de cada primer para *ZmMATE1* e 33,3 μM de cada primer para actina (Tabela 1), em volume final de 10 μL . As condições do termociclador foram: 95 °C por 20

segundos uma vez, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Tabela 1- Sequências de primers para quantificar o número de cópias do gene *ZmMATE1*, sendo o gene da actina utilizado como controle de gene cópia única.

Gene	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)
<i>ZmMATE1</i>	TGTGAGTTTGGCGGATGTGT	TCACAATCTAGGCCAGTACAACAGA
Actina	GATGATGCGCCAAGAGCTG	GCCTCATCACCTACGTAGGCAT

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ZmMATE1*

O experimento para avaliar o perfil de expressão do *ZmMATE1* foi realizado nas mesmas condições da avaliação da tolerância ao Al. As linhagens Cateto Al237 e L53 foram avaliadas em todos os experimentos, como controles. O material biológico utilizado foi 1 cm do ápice radicular de plântulas submetidas por 6 horas na solução nutritiva contendo {39} µM de atividade de Al³⁺. Cada amostra biológica foi composta por 21 ápices em cada linhagem, o material coletado foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a – 80° C até a extração.

O RNA total foi extraído com o kit SV Total RNA Isolation System (Promega Corporation), seguindo as recomendações do fabricante, seguido da reação de transcrição reversa. A reação de qPCR foi realizada segundo Guimaraes *et al.* (2014), utilizando os mesmos primers descritos na tabela 1, o gene da Actina como controle endógeno e a L53 como amostra calibradora. Os ensaios de quantificação foram realizados no equipamento 7500 Fast-Real Time PCR (Applied Biosystems), seguindo os protocolos e recomendações do fabricante baseados no sistema de detecção por SYBR Green. A expressão relativa foi obtida utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) com três repetições técnicas por amostra.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada característica avaliada, e as médias foram comparadas por meio do teste Scott-Knott ($p < 0,05$) utilizando o programa R (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria; <http://www.r-project.org>).

5. RESULTADOS

5.1. LINHAGENS DE MILHO SELECIONADAS QUANTO AO SNP NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ZmMATE1* E AO AGRUPAMENTO FILOGENÉTICO

A árvore filogenética apresenta a distribuição das 363 linhagens da Embrapa segundo Ribeiro (2015). Algumas linhagens realçadas em amarelo apresentaram o SNP T, e outras foram selecionadas por estarem filogeneticamente próximas, formando os grupos elencados de 1 a 7 (Figura 2).

Adicionalmente, o DNA de 21 linhagens do CIMMYT (Colômbia) foi genotipado com o marcador para revelar o SNP na região promotora do *ZmMATE1*. Essa genotipagem possibilitou a seleção de duas linhagens como o SNP T, além de outras duas aleatórias com o SNP C e com mesma classificação fenotípica, que estão realçadas em negrito na Tabela 2.

Tabela 2- Linhagens de milho do CIMMYT, Colômbia descritas como tolerante ou sensível ao alumínio e genotipadas quanto ao SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*. Em negrito estão as linhagens selecionadas para o presente trabalho.

Linhagem	Tolerância ao Al	SNP T/C	Linhagem	Tolerância ao Al	SNP T/C
SA2030-174	Tolerante	CC	SA1940-1	Tolerante	CC
SA1940-2	Tolerante	CC	SA2036-134	Sensível	TT
SA1940-3	Tolerante	CC	SA2007-41	Sensível	CC
SA2030-91	Tolerante	CC	SA1988-9	Sensível	CC
SA2030-131	Tolerante	CC	SA1972-30	Sensível	CC
SA2030-251	Tolerante	CC	SA1957-30	Sensível	CC
SA2007-33	Tolerante	CC	SA2030-127	Sensível	CC
SA1866-24	Tolerante	CC	SA1940-11	Sensível	CC
SA1940-4	Tolerante	CC	SA2030-47	Sensível	CC
SA1940-7	Tolerante	CC	SA1866-15	Sensível	CC
SA1988-8	Tolerante	TT	SA2030-173	Sensível	CC

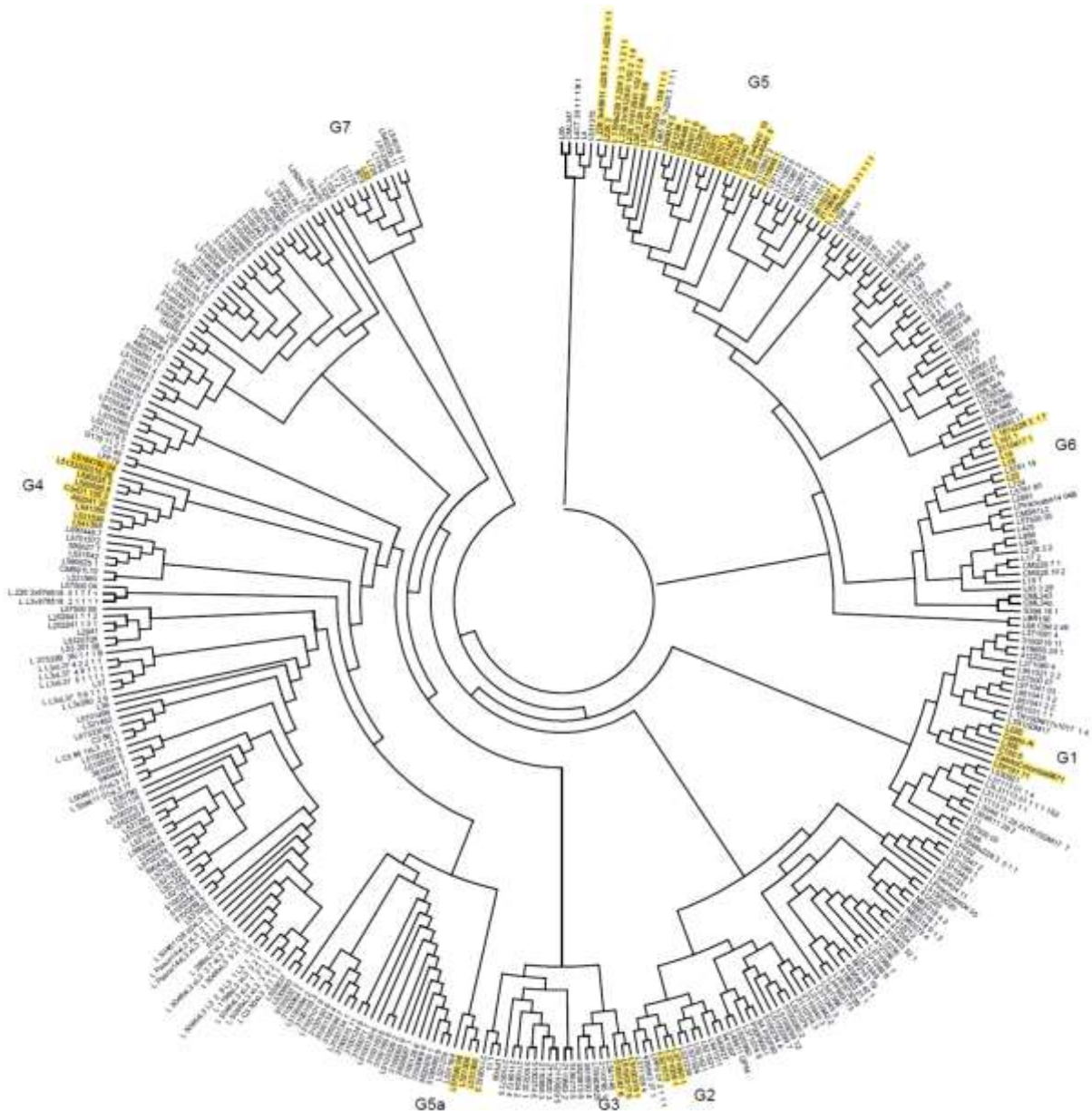


Figura 2- Árvore filogenética incluindo as 363 linhagens de milho da Embrapa genotipadas com base em 12.700 marcadores SNPs. Algumas linhagens realçadas em amarelo foram selecionadas por apresentarem o SNP T e outras pela formação de grupos filogenéticos, que foram indicados de G1 a G7. Adaptado de Ribeiro (2015).

Assim, o conjunto final de linhagens foi composto por 56 linhagens da Embrapa e quatro linhagens do CIMMYT. Este conjunto de linhagens foi caracterizado quanto a origem, grupo heterótico e agrupamento filogenético (Tabela 3). As linhagens selecionadas representam os dois grupos heteróticos do programa de melhoramento da Embrapa, incluindo o grupo Flint e Dent, além de linhagens intermediárias, que combinam de forma similar com ambos os grupos heteróticos, identificadas como intermediárias na Tabela 3. A ampla distribuição das linhagens selecionadas indica

uma boa representatividade do germoplasma elite da Embrapa. Essas linhagens foram agrupadas em sete clusters com base nas análises filogenéticas, que foram coerentes com as informações de sua origem genealógica (Tabela 3). As linhagens do CIMMYT complementaram o oitavo grupo, mas não estão na Figura 2 por não terem sido genotipadas junto com as linhagens da Embrapa.

Apenas 27 das 363 linhagens tropicais de milho apresentaram o alelo T, representando 5,6% do painel. Apesar do alelo T ser raro, linhagens contendo esse alelo estão bem distribuídas na árvore filogenética e representam todos os grupos heteróticos do programa de melhoramento da Embrapa.

As linhagens derivadas da L228-3 representaram metade das linhagens avaliadas (30) e foram agrupadas nos clusters 5, 5a e 6 (Figura 2). Tal seleção é justificada pelo fato dessa linhagem ter sido previamente identificada com uma fonte da alta expressão do gene *ZmMATE1*, com apenas uma cópia do gene (Guimaraes *et al.* 2014) e com o alelo T (Costa, 2017). A partir desse conjunto, todas as 60 linhagens foram caracterizadas quanto ao número de cópias e expressão do *ZmMATE1*, além da tolerância ao AI em solução nutritiva.

Tabela 3- Linhagens de milho da Embrapa e do CIMMYT, incluindo informações de origem, grupo heterótico, agrupamento filogenético com base da Figura 1 e SNP T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.

N°	Linhagem	Origem	Grupo Heterótico*	Cluster	SNP T/C
1	Cat100-6	Unicamp	Interm.	1	TT
2	Cateto AI237	Instit. Agron. BH	Interm.	1	TT
3	Piracicaba04_05	ESALQ	Interm.	1	CC
4	L22E	CMS36	Interm.	1	CC
5	L30E	CMS36	Interm.	1	TT
6	SLP181_71		Interm.	1	CC
7	Cateto Colômbia 9671	Colômbia	Interm.	1	CC
8	521573	Sintético Elite	Flint	2	TT
9	371056_1	Sintético Elite	Flint	2	CC
10	371060_1	Sintético Elite	Flint	2	CC
11	5100317_5	L31113-01-1-4	Flint	3	TT
12	5100318_1	Sintético Elite	Flint	3	CC
13	5100187_6	Sintético Elite	Flint	3	CC
14	541358	Sintético Elite	Flint	4	TT
15	521538	Sintético Elite	Flint	4	CC
16	541350	Sintético Elite	Flint	4	TT
17	482041_30	Sintético Elite	Flint	4	CC
18	C3xD1_105_3	CMS14	Flint	4	CC

19	580056_8	L31113-01-1-4	Flint	4	TT
20	580035_2	Sintético Elite	Flint	4	CC
21	5133302016_08	Sintético Elite	Flint	4	CC
22	5184180_04	Sintético Elite	Flint	4	CC
23	(228_3x45611)x228_3)_2_4) x228_3)_1_1	228-3	Dent	5	TT
24	L228-3	Tuxpeño	Dent	5	TT
25	(1199x228_3)228_3)_3)_ 1_2_1_1	228-3	Dent	5	CC
26	(228_3x1612841_102_2)_1_4	228-3	Dent	5	CC
27	L56_3_228_9560	228-3	Interm.	5	CC
28	L57330_910	228-3	Dent	5	TT
29	(106x228_3)_158_1_1_1	228-3	Dent	5	TT
30	L590074_2	228-3	Dent	5	CC
31	521236	228-3	Dent	5	TT
32	590449_1	228-3	Dent	5	TT
33	590072_6	228-3	Dent	5	CC
34	5702816	228-3	Dent	5	CC
35	521237	228-3	Dent	5	TT
36	5702973	228-3	Dent	5	CC
37	590101_3	228-3	Dent	5	TT
38	3810145_3	228-3	Dent	5	TT
39	57500_02	228-3	Interm.	5	CC
40	514040	228-3	Interm.	5	CC
41	(228_3x4040)_19	228-3	Dent	5	TT
42	(228_3x4040)_8	228-3	Dent	5	TT
43	211_0646_1	228-3	Dent	5	TT
44	3810227_1	228-3	Dent	5	CC
45	221_0606_1	228-3	Dent	5	CC
46	(1199x228_3)_3_1_1_1_1	228-3	Dent	5	TT
47	531360	228-3	Dent	5a	TT
48	521306	228-3	Dent	5a	TT
49	57500_06	228-3	Interm.	5a	CC
50	(161x228_3)_1_7	228-3	Dent	6	CC
51	L161-1	228-3	Dent	6	CC
52	211_0417_1	228-3	Dent	6	CC
53	L19	Tuxpeño	Interm.	6	TT
54	L22	Tuxpeño	Interm.	6	TT
55	L18	Tuxpeño	Interm.	6	CC
56	L53	BR111, Pool 21	Interm.	7	CC
57	SA1988-8 / CLA321	CIMMYT		8	TT
58	SA1940-1 / CLA84	CIMMYT		8	CC
59	SA2036-134 / CML451	CIMMYT		8	TT
60	SA2007-41 / CML444	CIMMYT		8	CC

*Interm. São as linhagens intermediárias que combinam bem com os dois grupos heteróticos.

5.2. VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *ZmMATE1*

O número de cópias do gene *ZmMATE1* foi determinado pelo método de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Além das linhagens previamente descritas com o gene em triplicata, Cateto AI237 e Cat100-6 (Maron *et al.* 2013), outras três linhagens (5100317_5, 580056_8 e CLA321) também apresentaram três cópias do *ZmMATE1*. As duas primeiras linhagens são Flint e pertencentes aos grupos 3 e 4 da Embrapa, respectivamente, e a terceira é do CIMMYT. O polimorfismo estrutural de três cópias do gene foi identificado em 1,03% das linhagens avaliadas e todas essas cinco linhagens apresentaram o alelo T na região promotora do *ZmMATE1*. A Figura 3 representa um sub-grupo de linhagens avaliadas quanto ao número de cópias do gene *ZmMATE1*.

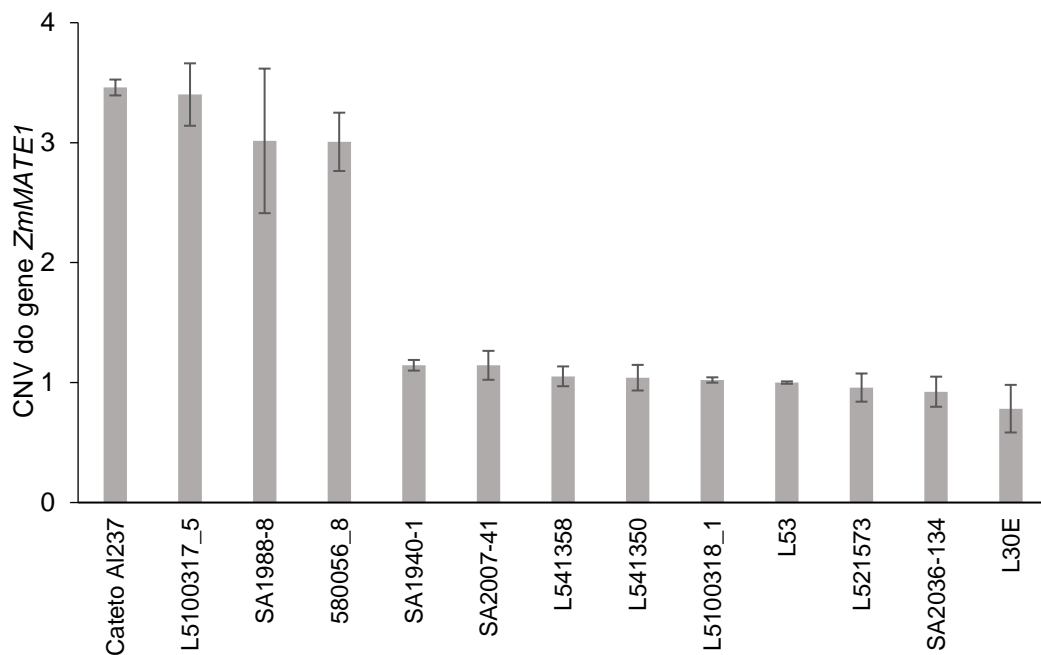


Figura 3- Estimativa do número de cópias (CNV) do gene *ZmMATE1* baseada em PCR quantitativo em um sub-grupo de linhagens da Embrapa e do CIMMYT.

5.3. EXPRESSÃO DO GENE *ZmMATE1* E TOLERÂNCIA AO AI NO PAINEL DE LINHAGENS TROPICAIS DE MILHO

A expressão do gene *ZmMATE1* no ápice radicular após 6 horas de estresse por AI apresentou uma distribuição aparentemente contínua. No entanto, dois grandes grupos podem ser verificados, um deles com baixa expressão, incluindo os grupos i e j pelo teste de Scott-Knott a 5% e outro com alta expressão (Figura 4). A alta expressão do gene *ZmMATE1*, até então identificada em Cateto AI237, L228-3 e suas derivadas, possui uma quantificação relativa (RQ) entre 6 e 10 (Guimaraes *et al.* 2014), faixa que inclui a maioria das linhagens, que fazem parte dos grupos de b a g. No entanto, nota-se que a linhagem (1199x228_3)_3_1_1_1_1 (identificada como 46 na Figura 4) possui uma expressão muito alta ($RQ > 16$) e duas linhagens, L57330_910 (28) e 57500_06 (49) possuem RQ na faixa de 4 (grupo h), que podem ser considerados padrões de expressão diferentes daqueles até então reportados (Maron *et al.* 2010; Guimarães *et al.* 2014). Assim, os dados dessas linhagens serão repetidos sendo eliminados das análises subsequentes.

Já a tolerância ao AI avaliada em solução nutritiva com base no crescimento relativo da raiz seminal (CRR) apresentou uma distribuição contínua e uma ampla variabilidade no painel de 60 linhagens tropicais de milho (Figura 5). Quatro linhagens se destacaram com CRR acima de 100%, incluindo duas linhagens, Piracicaba 04_05 e L57330_910, além da Cateto AI237 e da Cat100-6, já caracterizadas como padrão de tolerância ao AI em milho. Outras cinco linhagens, que compõem o grupo c, apresentaram CRR entre 90 e 80%, sendo também classificadas como tolerantes ao AI. No outro extremo, cinco linhagens apresentaram CRR abaixo de 30% (grupo h na Figura 4) e foram classificadas como sensíveis ao AI. As demais linhagens apresentaram níveis intermediários de tolerância ao AI, sendo classificadas em quatro grupos pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

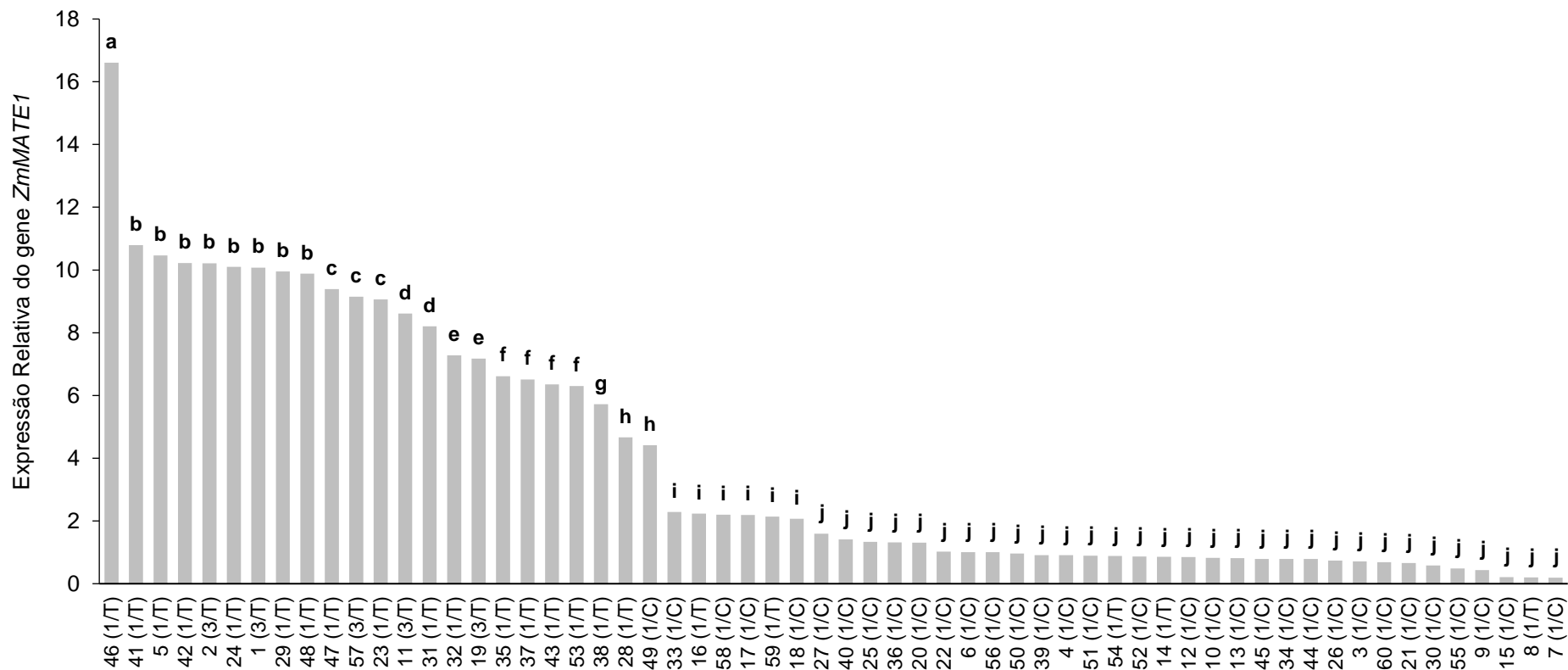


Figura 4- Expressão relativa do gene *ZmMATE1* no ápice radicular após 6 horas de tratamento com Al em 60 linhagens tropicais de milho. Linhagens identificadas com as mesmas letras fazem parte de grupos homogêneos de expressão relativa do gene *ZmMATE1* pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os números de 1 a 60 no eixo x representam as linhagens do painel conforme descritas na Tabela 3. Entre parênteses está a descrição do número de cópias 1/3 e o polimorfismo T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.

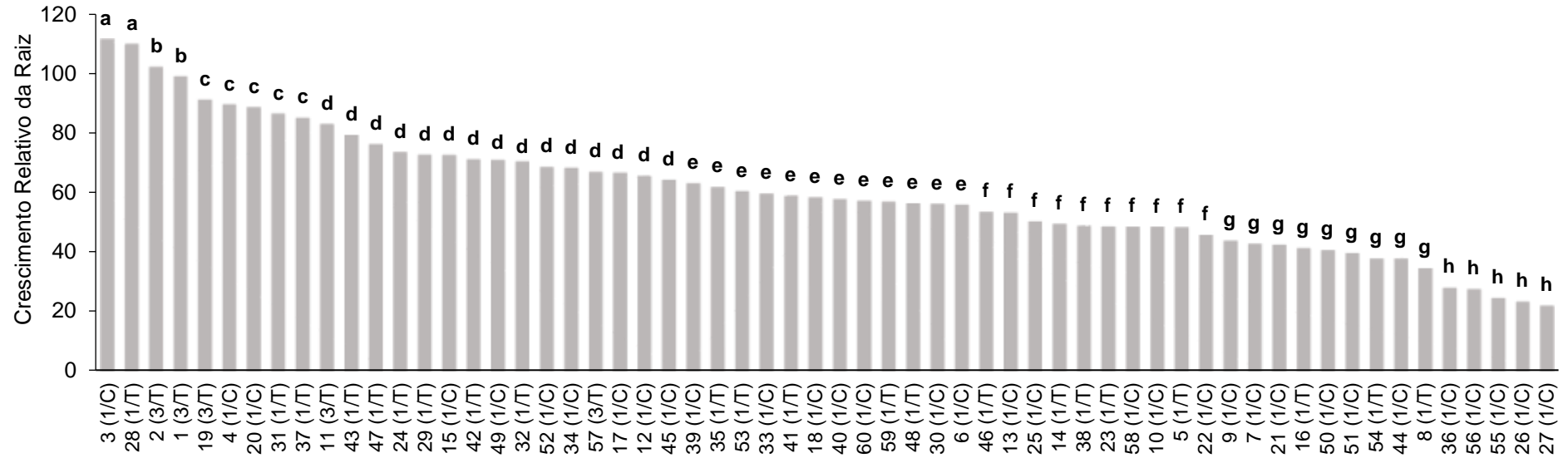


Figura 5- Tolerância ao alumínio em linhagens de milho da Embrapa Milho e Sorgo e do CIMMYT avaliada com base no crescimento relativo da raiz (CRR) em solução nutritiva. Linhagens identificadas com as mesmas letras fazem parte de grupos homogêneos de CRR pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os números de 1 a 60 no eixo x representam as linhagens do painel conforme descritas na Tabela 3. Entre parênteses está a descrição do número de cópias 1/3 e o polimorfismo T/C na região promotora do gene *ZmMATE1*.

Desconsiderando as três linhagens com padrão de expressão do gene *ZmMATE1* atípicos, uma correlação positiva entre a expressão e a tolerância no painel foi observada ($R^2 = 0,21$) (Figura 6). Essa correlação positiva indica que linhagens com alta expressão do gene *ZmMATE1* tendem a ser mais tolerantes ao AI, conforme validado em uma população de linhagens recombinantes, cujo QTL contendo esse gene explica de 16% (Maron *et al.* 2010) a 30% (Guimaraes *et al.* 2014) da tolerância ao AI. No entanto, algumas linhagens com baixa expressão do *ZmMATE1* foram altamente tolerantes, indicando a presença de outros genes e mecanismos de tolerância ao AI.

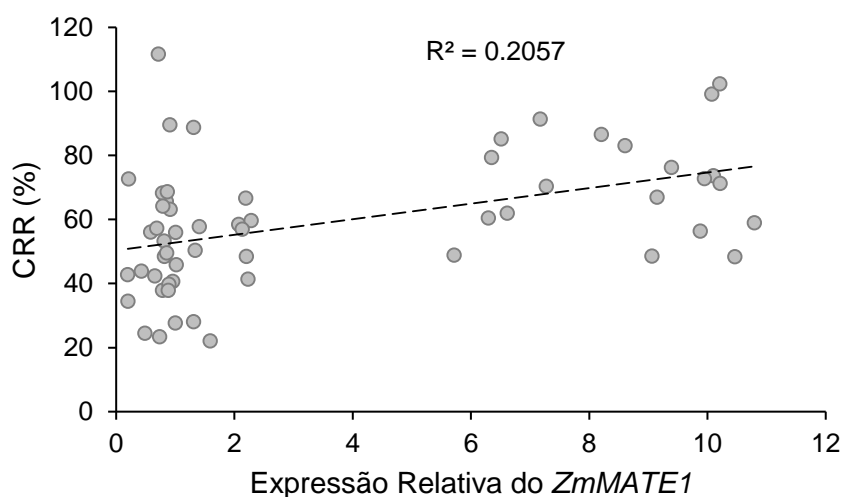


Figura 6- Correlação entre a expressão relativa do gene *ZmMATE1* e a tolerância ao AI avaliada com base no crescimento relativo da raiz seminal (CRR) em um painel de 57 linhagens tropicais de milho.

Quando as linhagens foram classificadas quanto à presença do polimorfismo C/T na região promotora e ao número de cópias do gene *ZmMATE1*, três classes foram obtidas conforme apresentado na Figura 7. Todas as linhagens com o alelo C possuíam uma cópia do gene, resultando em uma baixa expressão, mas com uma ampla faixa de tolerância ao AI. As linhagens com o alelo T aumentaram significativamente a expressão do *ZmMATE1*, apesar de um pequeno número de linhagens ainda possuírem baixa expressão, mas com tolerância ao AI variando de intermediária a alta. Já, as linhagens que combinaram as três cópias do gene e o alelo T foram consistentes quanto a alta expressão do gene *ZmMATE1* e alta tolerância ao AI (Figura 7).

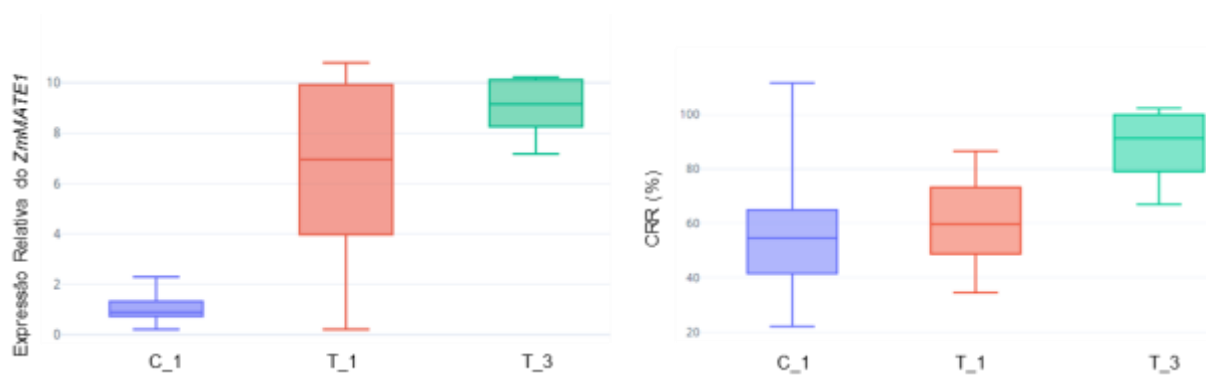


Figura 7- Boxplot da expressão relativa do gene *ZmMATE1* e da tolerância ao alumínio medida em CRR no painel de linhagens de milho classificadas quanto ao polimorfismo (C/T) e ao número de cópias (3/1) do gene *ZmMATE1*.

6. DISCUSSÃO

O gene *ZmMATE1*, que codifica um transportador de citrato, é induzido pelo AI no ápice radicular, sendo responsável pela tolerância ao AI em milho conferido pelo QTL, *qALT6*, nas RILs derivadas da linhagem Cateto AI237 (Maron *et al.* 2010; Guimaraes *et al.* 2014). A presença das três cópias em tandem desse gene foi associada com a alta expressão do *ZmMATE1* em Cateto AI237 e, conseqüentemente, com a maior tolerância ao AI (Maron *et al.* 2013). A caracterização de um painel com ampla variabilidade genética confirmou que o gene *ZmMATE1* em triplicata confere a super-expressão desse gene e os altos níveis de tolerância ao AI.

As linhagens com o alelo C e com uma cópia do gene *ZmMATE1* foram as mais frequentes no painel, apresentando baixa expressão do gene *ZmMATE1* e uma ampla variabilidade quanto à tolerância ao AI. Assim, é possível sugerir que esse seria o estado original do gene *ZmMATE1*. Apesar de grande parte de essas linhagens serem sensíveis ou com tolerância intermediária, duas linhagens se destacaram pelos altos níveis de tolerância ao AI, Piracicaba 04.05 (CRR de 112%) e L22E (CRR de 90%). Altos níveis de tolerância ao AI foram encontrados em raças nativas de milho do Quênia, com baixa expressão do gene *ZmMATE1* em relação à Cateto AI237 (Matonyei *et al.* 2014), indicando a existência de outros mecanismos e genes que conferem altos níveis de tolerância ao AI em milho. De forma interessante, as duas linhagens com alta tolerância e baixa expressão do *ZmMATE1* (Piracicaba 04.05 e L22E) foram filogeneticamente agrupadas com as linhagens Cateto AI237 e Cat100-6 (G1), as duas principais fontes de tolerância ao AI em milho (Maron *et al.* 2010; Guimaraes *et al.* 2014). Tais resultados sugerem que esse agrupamento combina linhagens com diferentes genes e mecanismos de tolerância ao AI, além de agregar as principais fontes do alelo superior do gene *ZmMATE1*. Assim, a genealogia dessas linhagens deve ser investigada para buscar as possíveis origens dos genes que controlam a tolerância ao AI em milho.

O gene *ZmMATE1* tem sido alvo de vários estudos genético-moleculares pela equipe multidisciplinar da Embrapa Milho e Sorgo por conferir ganhos significativos na tolerância ao AI em linhagens isogênicas (Guimaraes *et al.* 2014). A correlação de 0.21 entre a tolerância ao AI e a expressão do gene *ZmMATE1* no painel envolvendo linhagens de milho com alta diversidade está coerente com a variância explicada pelo

QTL controlado por esse gene em uma população de RILs, que variou de 16% (Maron *et al.* 2010) a 30% (Guimaraes *et al.* 2014). Tais resultados indicam que a expressão do gene *ZmMATE1* explica em torno de 20% da tolerância ao AI em milho, justificando os estudos sobre os polimorfismos associados com a expressão desse gene.

O alelo T na região promotora do gene foi inicialmente identificado em um pequeno número de linhagens com alta expressão do gene *ZmMATE1* (Barros *et al.* 2016), cuja tendência foi confirmada quando o polimorfismo foi avaliado no painel, uma vez que as linhagens com o alelo T apresentaram níveis superiores de expressão do gene *ZmMATE1* em relação às linhagens com o alelo C. No entanto, cinco linhagens com o alelo T apresentaram baixa expressão do *ZmMATE1*, coincidindo com aquelas mais sensíveis ao AI tóxico..

Dentre as 27 linhagens que apresentaram o alelo T, 15 são derivadas da L228-3, linhagem já caracterizada quanto à presença de uma cópia e alta expressão do *ZmMATE1* (Guimaraes *et al.* 2014) e do alelo T (Costa, 2017). A L19 apresentou esse mesmo padrão (alelo T, uma cópia e alta expressão do *ZmMATE1*), estando alocada no grupo 6, juntamente com outras linhagens derivadas da L228-3. A proximidade filogenética é justificada, uma vez que ambas as linhagens são derivadas do Composto Tuxpeño (Parentoni *et al.*, 2001). A linhagem L30E também possui padrão similar ao dessas duas linhagens e é derivada da população CMS36, pertencendo ao mesmo grupo filogenético de Cateto AI237 e Cat100-6. Assim, é plausível sugerir que o polimorfismo T na região promotora do *ZmMATE1* tenha uma fonte no Composto Tuxpeño e outra no grupo dos Catetos.

Além das linhagens Cateto AI237 e Cat100-6, previamente caracterizadas com três cópias do *ZmMATE1* (Maron *et al.* 2013), três linhagens do painel também apresentaram esse padrão. As linhagens 5100317_5 e 580056_8 são derivadas do programa de melhoramento da Embrapa e, apesar de estarem em grupos filogenéticos distintos (3 e 4), pertencem ao mesmo grupo heterótico, Flint, e possuem uma linhagem genitora em comum L31113_01_1_4. A linhagem SA1988-8 foi obtida do CIMMYT na Colômbia, a partir de um programa de melhoramento para solos ácidos. Embora tenham sido identificadas as três novas linhagens com o gene *ZmMATE1* em triplicata, esse polimorfismo estrutural continua sendo raro e prevalente no germoplasma de milho derivado da América do Sul. Anteriormente, Maron *et al.* (2013) descreveram esse alelo como originado do Brasil e da Bolívia, sendo agora

expandido para mais uma linhagem da Colômbia, países que possuem regiões com alta incidência de solos ácidos.

Apesar de estudos mais aprofundados sobre a genealogia dessas linhagens e dos grupos filogenéticos que concentram os genes e os alelos de interesse serem necessários para possibilitar inferências sobre a origem desses polimorfismos, algumas hipóteses podem ser levantadas com base nos resultados aqui descritos. O polimorfismo T/C é mais frequente no conjunto de linhagens de ampla diversidade tropical e está associado com níveis variáveis de expressão do *ZmMATE1*, sendo possível sugerir que esse polimorfismo de nucleotídeo único tenha surgido primeiro que o polimorfismo estrutural, com uma origem provável no Composto Tuxpeño e em linhagens derivadas da raça Cateto. Posteriormente, ocorreu a variação no número de cópias do gene *ZmMATE1*, cuja organização em triplicata foi fixada em raças de milho cultivadas no Brasil, predominantemente Cateto, na Bolívia e na Colômbia, considerando que as linhagens até então identificadas com três cópias do *ZmMATE1* são originárias desses países.

O Composto Tuxpeño foi trazido do México para o Brasil e a raça Cateto foi cultivada pelos indígenas em toda a Costa Atlântica, desde o Nordeste até o sul da Argentina (Paterniani & Goodman, 1977). Assim, duas possibilidades podem ser levantadas sobre a origem dessas mutações: surgiram no centro primário de diversidade do milho, no México, ou surgiram no centro secundário de diversidade do milho, nas terras baixas do sudoeste da Amazônia, seguindo o modelo da domesticação estratificada do milho proposto recentemente por Kistler *et al.* (2018). Esses autores identificaram uma elevada carga de mutação nos milhos das terras baixas da América do Sul, sugerindo um efeito fundador nessa região seguida de uma pressão seletiva persistente para adaptações regionais (Kistler *et al.*, 2018). Essa segunda hipótese seria consistente com o fato de as três cópias do gene *ZmMATE1* não terem sido identificadas no teosinto (Maron *et al.*, 2013), ancestral do milho originário do México. No entanto, outro ancestral que deu origem ao germoplasma Tuxpeño pode ter sido a fonte do polimorfismo C/T. Já, a variação no número de cópias pode ter ocorrido no centro secundário de diversificação do milho, onde a pressão seletiva na região de solos ácidos levou à fixação desses polimorfismos que culminaram no aumento da expressão do gene *ZmMATE1*, conferindo os altos níveis de tolerância ao Al. Como consequências, esses polimorfismos apresentam baixas frequências na espécie e são prevalentes em grupos filogenéticos específicos, à

semelhança do alelo superior do gene *SbMATE*, que confere tolerância ao AI em sorgo, que também é raro e está em maior frequência nos acessos da raça guinea (Caniato *et al.* 2011).

7. CONCLUSÃO

Uma ampla variabilidade genética e fenotípica para a tolerância ao Al foi explorada no painel representado por linhagens de milho da Embrapa e do CIMMYT. Novas fontes e combinações dos polimorfismos relacionados ao número de cópias e ao SNP na região promotora do *ZmMATE1* foram identificadas, consolidando algumas das inferências como: (i) o *ZmMATE1* em triplicata confere maior expressão do gene, maior tolerância ao Al e trata-se de um evento raro no germoplasma de milho tropical; (ii) o alelo T na região promotora do *ZmMATE1* está associado com aumento nos patamares de expressão do gene, mas não em todas as linhagens; e (iii) a expressão do gene *ZmMATE1* explicou em torno de 20% da tolerância ao Al em milho, sendo consistente com o efeito do gene em populações segregantes e com a existência de diferentes mecanismos de tolerância ao Al nessa espécie. Assim, as linhagens aqui identificadas podem ser alvo para a busca por novos genes e alelos envolvidos na tolerância ao Al em milho e para piramidação de mecanismos de tolerância em programas de melhoramento, visando o aumento da estabilidade da produção em solos ácidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARENHART, R.A.; LIMA, J.C.; PEDRON, M.; CARVALHO, F.E L.; SILVEIRA, J.A.G.; ROSA, S.B.; CAVERZAN, A.; ANDRADE, C.M.B.; SCHÜNEMANN, M.; MARGIS, R.; MARGIS-PINHEIRO, M. (2013). Involvement of ASR genes in aluminum tolerance mechanisms in rice. *Plant Cell & Environment* 36: 52 - 67.
- BARROS, B.A.; LANA, U.G.P.; POSSA, K.F.; ANDRADE, L.C.S.S.; SILVA, V.L.; LOPES, F.A.; CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P.; MAGALHAES, J.V.; GUIMARAES, C.T. (2011) Estimativa do número de inserções de transgenes em milho por PCR quantitativo (qPCR). (Circular Técnica).
- BARROS, B.A.; MITRE, L.K.; PINTO, M.O., MAGALHÃES, J.V.; GUIMARÃES, L.J. M., GUIMARÃES, C.T. (2016). Marcador alelo-específico associado com níveis de expressão do gene *ZmMATE1* em milho. Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Bento Gonçalves.
- CANIATO, F.F.; GUIMARÃES, C.T.; HAMBLIN, M.; BILLOT, C.; RAMI, J.F.; HUFNAGEL, B.; KOCHIAN, L.V.; LIU, J.; GARCIA, A.A.F.; HASH C.T.; RAMU, P.; MITCHELL, S.; KRESOVICH, S.; OLIVEIRA, A.C.; AVELLAR, G.; BORÉM, A.; GLASZMANN, J.C.; SCHAFFERT, R.E.; MAGALHÃES, J.V. (2011). The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. *Plos ONE* 6: 1-14.
- CARRARI, F.; FERNIE, A.R.; IUSEM, N.D. (2004). Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: The ASR story. *Trends Plant Science* 9: 57–59.
- COLLINS, N.C.; SHIRLEY, N.J.; SAEED, M.; PALLOTTA, M.; GUSTAFSON, J.P. (2008) An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 179: 669–682.

- COSTA, M.B.R. (2017). Caracterização molecular de um novo alelo do gene *ZmMATE1* que confere tolerância ao alumínio em milho. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. (1998). Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiology* 117: 19-27.
- DELHAIZE, E.; TAYLOR, P.; HOCKING, P. J.; SIMPSON, R.J.; RYAN, P.R.; RICHARDSON, A.E. (2009). Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminum resistance gene (TaALMT1) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnology Journal* 7: 391-400.
- DING, Z.J.; YAN, J.Y.; XU, X.Y.; LI, G.X.; ZHENG, S.J. (2013). WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 76:825–35.
- ECHART, C.L.; MOLINA, S. (2001). Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Ciência Rural* 31: 531-541.
- FAGERIA, N.K. & STONE, L.F. (1999) Manejo da acidez dos solos de cerrado e de várzea do Brasil. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão 92: 42.
- FERREIRA, R. de P.; MOREIRA, A.; RASSINI, J.B. (2006). Toxidez de alumínio em culturas anuais. Embrapa Pecuária Sudeste, 34.
- FOY, C.D.; CHANEL, R.L.; WRITE, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review Plant Physiology* 29: 511-566.
- FREITAS, F.A.; KOPP, M.M.; SOUSA, R.O.; ZIMMER, P.D.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. (2006). Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. *Ciência Rural* 36: 72-79.

FUJII, M.; YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; SAISHO, D.; YAMANE, M.; TAKAHASHI, H.; SATO, K.; NAKAZONO, M.; MA, J.F. (2012). Acquisition of aluminum tolerance by modification of a single gene in barley. *Nature Communications* 3:713.

GUIMARÃES, C.T.; SIMÕES, C.C.; PASTINA, M. M.; MARON, L.G.; MAGALHAES, J.V.; VASCONCELLOS, R. C. C.; GUIMARÃES, L. J. M.; LANA, U. G. P.; TINOCO, C. F. S.; NODA, R. W.; JARDIM-BELICUAS, S. N.; KOCHIAN, L. V.; ALVES, V. M. C.; PARENTONI, S. N. (2014). Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. *BMC Genomics* 15(1): 153.

GRUBER, B.D.; RYAN, P.R.; RICHARDSON, A.E.; TYERMAN, S.D.; RAMESH, S. (2010). HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *Journal of Experimental Botany* 61: 1455–1467.

HENIKOFF, S.; GREENE, E.A.; PIETROKOVSKI, S.; BORK, P.; ATTWOOD, T.K.; HOOD, L. (1997). Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278: 609–14.

HOEKENGA, O.; MARON, L.G.; PINEROS, M.A.; CANCADO, P. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 9738–9743.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; MITANI, N.; YANO, M.; NAGAMURA, Y.; MA, J.F. (2009). A bacterial type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell* 21(2): 655-667.

HUANG, C.F.; YAMAJI, N.; CHEN, Z.; MA, J.F. (2012). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant Journal* 69(5):857-867.

IUCHI, S.; KOYAMA, H.; IUCH, A.; KOBAYASHI, Y.; KITABAYASHI, S.; KOBAYASHI, Y.; IKKA, T.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K.; KOBAYASHI, M. (2007). Zinc finger

protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 9900–9905.

IUSEM, N.D.; BARTHOLOMEW, D.M.; HITZ, W.D.; SCOLNIK, P.A. (1993). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol* 102: 1353–1354.

JONES, D.L.; KOCHIAN, L.V. (1995). Aluminum inhibition of the 1, 4, 5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* 7: 1913-1922.

KISTLER, L.; MAEZUMI, S.Y.; SOUZA, J.G.; PRZELOMSKA, N.A.S.; COSTA, F.M.; SMITH, O.; LOISELLE, H.; RAMOS-MADRIGAL, J.; WALES, N.; RIBEIRO, E.R.; MORRISON, E.R.; GRIMALDO, C.; PROUS, A.P.; ARRIAZA, B.; GILBERT, M.T.P.; FREITAS, F.O.; ALLABY, R.G. (2018) Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. *Science* 362: 1309-1313.

KOCHIAN, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology* 46(1): 237-260.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J.V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology* 66: 1-23.

LARSEN, P.B.; GEISLER, M.J.; JONES, C.A.; WILLIAMS, K.M.; CANCEL, J.D. (2005). ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal* 41(3): 353-363.

- LARSEN, P.B.; CANCEL, J.; ROUNDS, M.; OCHOA, V. (2007). Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225: 1447–1458.
- LIGABA, A.; KATSUHURA, M.; RYAN, P.R.; SHIBASAKA, M.; MATSUMOTO, H. (2006). The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiology* 142: 1294–1303.
- LIU, J.P.; MAGALHÃES, J.V.; SHAFF, J.; KOCHIAN, L.V. (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.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y.H.; SORRELIS, M.E.; KLEIN, P.E.; SCHAFFERT, R.E.; LI, L.; KOCHIAN, L.V. (2004). Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. *Genetics* 167: 1905-1914.
- MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T.; LANA, U.G.P.; ALVES, V.M.C.; WANG, Y.; SCHAFFERT, R.E.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; KLEIN, P.E.; CARNEIRO, N.P.; COELHO, C.M.; TRICK, H.N.; KOCHIAN, L.V. (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, C.O.; CLARK, R.B. (1987). Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H.W.; LOUGHMAN, B.C. (Eds.). *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. 255-265.

- MARON L. G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M.J.; MENOSSI, M., KOCHIAN, L.V. (2008). Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytologist* 179 (1): 116–128.
- MARON L. G; PIÑEROS, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; PLEIMAN, J. K.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S.N.; KOCHIAN, L.V. (2010). Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* 61: 728-740.
- MARON L.G.; GUIMARÃES, C.T.; KIRST, M.; ALBERT, P.S.; BIRTCHLER, J.A.; BRADBURY, P.J.; BUCKLER, E.S.; COLUCCIO, A.E.; DANILOVA, T.V.; KUDRNA, D.; MAGALHAES, J.V.; PIÑEROS, M.A.; SCHATZ, M.C.; WING, R.A.; KOCHIAN, L.V. (2013). Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 5241-5246.
- MATONYEI, T.K.; CHEPROT, R.K.; LIU, J.; PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E. GUDU, S.; MAGALHÃES, J.V.; KOCHIAN, L.V. (2014). Physiological and molecular analysis of aluminum tolerance in selected Kenyan maize lines. *Plant and Soil* 377 (1-2): 357-367.
- MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, F.; TORIKAI, H.; TAKAHASHI, E. (1976). Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nuclei acid. *Plant Cell Physiology* 17: 627-631.
- MIGUEL, P.S.B.; GOMES, F.T.; ROCHA, W.S.D.; MARTINS, C.E.; CARVALHO, C.A.; OLIVEIRA, A.V. (2010). Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES Revista* 24: 13-24.
- NINAMAGO-CARDENAS, F.; GUIMARÃES, C.T.; MARTINS, P.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P.; LOPES, M.A.; MORO, J.R.; PAIVA, E. (2003). Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. *Euphytica* 130: 223–232.

- OLMOS, I.L.J. & CAMARGO, M.N. (1976). Ocorrência de alumínio tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. *Ciências e Cultura* 28: 171-80.
- PANDA, S.K.; BALUSCA, F.; MATSUMOTO, H. (2009) Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* 4 (7): 592-597.
- PANDEY, S.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C.; DUGUE-VARGES J.; VINASCO, Le. (1994). Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. *Crop Science*, 34:1511-1514.
- PARENTONI, S.N; MAGALHÃES, J.V.; PACHECO, C.A.P.; SANTOS, M.X.; ABADIE, T.; GAMA, E.E.G.; GUIMARÃES, P.E.O.; MEIRELLES, W.F.; LOPES, M.A.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. (2001). Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and phylogenetic relationship determined by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. *Kluwer Academic Publishers* 121: 197-208.
- PATERNIANI, E.; GOODMAN, M. M. (1977) Races of maize in Brazil and adjacent areas. CIMMYT, Mexico City.
- PEIXOTO, P.H.P.; PIMENTA, D.S.; CAMBRAIA, J. (2007). Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. *Bragantia* 66: 17-25.
- POURNOURMOHAMMADI, S.; KHAZAELI, P.; ESLAMIZAD, S.; TAJVAR, A.; MOHAMMADIRAD, A.; ABDOLLAHI, M. (2008). Study on the oxidative stress status among cement plant workers. *Human & Experimental Toxicology* 27: 463–469.
- QUINTAL, E.M.; MAGANA, C.E.; MACHADO, I.L.; ESTÉVEZ, M.M.(2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-18.

- RENGEL, Z. (1996) Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytologist*, Oxford, 134(3): 389-406.
- RIBEIRO, C.A.G. (2015). Identificação de regiões genômicas relacionadas à seca e à deficiência de fósforo via análise de ligação e mapeamento associativo em milho tropical. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.
- RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. (1996) Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Science* 36:905-909.
- RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. (1993). Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at the root apex in near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum*) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiology* 102: 975-982.
- RYAN, P.R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W.J.; DELHAIZE, E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology* 149: 340-351.
- RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D.; SASAKI, T.; FURUICHI, T.; YAMAMOTO, Y.; ZHANG, W.H.; DELHAIZE, E. (2011). The identification of aluminum-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany* 62: 9-20.
- SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M.S.L.; SURAVAJHALA, P.; KISHOR, P.B.K. (2016). Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals* 29: 187–210.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(24): 8014 – 8018.
- SANTIAGO, A.D.; ROSSETTO, R. (2005). Calagem. *Árvore do conhecimento: cana-de-açúcar*. Agência da Embrapa de Informação Tecnológica.

- 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.
- SIBOV, S.T.; GASPAR, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A.P. (1999). Two genes controlling aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. *Genome* 42:475-482.
- VON UEXKÜLL, H.R. & MUTERT, E. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171: 1-15.
- XIA, J.; YAMAJI, N.; KASAI, T.; MA, J.F. (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 18381-18385.
- YAMAJI, N.; HUANG, C.F.; NAGAO, S.; YANO, M.; SATO, Y.; NAGAMURA, Y. & MA, J. F. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell* 21 (10): 3339-3349.
- YANG, Q.; WANG, Y.; ZHANG, J.; SHI, W.; QIAN, C.; PENG, X. Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: Cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics* 7: 737-749, 2007.
- YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J.F. (2010). Isolation and characterization of two MATE genes in rye. *Functional Plant Biology* 37: 296-303.
- YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J.F. (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *The Plant Journal* 68: 1061-1069.