

# MARCADORES SSR ASSOCIADOS COM A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO.(ZEA MAYS L.)

F.E. NINAMANGO-CÁRDENAS, C.T. GUIMARÃES, S.N. PARENTONI, N.P. CARNEIRO, P.R. MARTINS, M.A. LOPES, J.R. MORO e E. PAIVA

EMBRAPA Milho e Sorgo, Caixa Postal 151 Sete Lagoas - MG, 35701-970  
edilson@cnpms.embrapa.br

Palavras-chave: tolerância ao alumínio, microsatélite, mapeamento, SSR

## INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos em solução nutritiva e em condições de campo têm sido realizados para elucidar a genética da tolerância ao alumínio em milho. Embora, os resultados sejam conflitantes quanto ao número de genes e ao tipo de ação gênica envolvida no controle desta característica, parece existir um consenso quanto à existência de poucos genes envolvidos na expressão da tolerância. Segundo Pandey & Gardner (1992), a tolerância ao alumínio é uma característica quantitativa com predominância de efeitos genéticos aditivos, porém Rhue *et al.* (1978) e Magnavaca (1982) não descartam a possibilidade da atuação de genes maiores no controle desta característica.

A maioria das características economicamente importantes nas espécies cultivadas são de herança quantitativa, mais complexas de serem manipuladas e estudadas geneticamente. O advento dos marcadores moleculares associado às metodologias estatísticas, tem possibilitado a dissecação dos caracteres complexos em fatores mendelianos simples, possibilitando estimar o número e a localização de genes que controlam a variação fenotípica de um caráter, a magnitude dos seus efeitos e as interações com outros QTLs. O conhecimento das bases genéticas e dos mecanismos responsáveis pela tolerância ao alumínio constitui uma ferramenta importante tanto para o monitoramento dos programas de melhoramento genético quanto para estudos de clonagem e expressão gênica.

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados no mapeamento genético e de QTLs em plantas. No entanto, os microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido amplamente utilizados pelo fato de serem co-dominantes, multialélicos e de conterem uma grande quantidade de informação genética por loco. Microsatélites consistem de pequenas seqüências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos em tandem, sendo flanqueados por seqüências conservadas e distribuídos em abundância no genoma eucarioto (Litt & Luty, 1989). Assim, as regiões altamente repetitivas podem ser amplificadas via PCR utilizando *primers* complementares às seqüências conservadas flanqueadoras (Saiki *et al.*, 1988).

O Programa de Melhoramento de Milho para Solos Ácidos desenvolvido pela EMBRAPA Milho e Sorgo tem lançado uma série de variedades e híbridos comerciais adaptados para as condições de solos com altos níveis de alumínio tóxico. Utilizando linhagens contrastantes para a tolerância ao alumínio advindas do programa de melhoramento foram iniciados trabalhos visando a identificação de regiões genômicas envolvidas com a tolerância ao alumínio em milho. Torres *et al.* (1997) identificaram três sondas de RFLP localizadas no cromossomo 8 capazes de distinguir os parentais contrastantes e os *bulks* suscetíveis e tolerantes ao alumínio. Martins *et al.* (1999) concluíram que os valores médios de comprimento relativo e comprimento líquido da raiz seminal (CRRS e CLRS,

respectivamente) são índices fenotípicos eficientes para avaliar a tolerância ao alumínio em milho. Utilizando tais índices fenotípicos para avaliar 168 famílias F<sub>3</sub>, Martins *et al.* (2000) encontraram cinco marcadores RFLP associados com a tolerância ao alumínio.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de testar marcadores SSR distribuídos ao longo de todo o genoma do milho e identificar regiões genômicas associadas com a tolerância ao alumínio, em uma população segregante F<sub>4</sub> proveniente do cruzamento entre duas linhagens contrastantes para esta característica, e ainda, quantificar os efeitos dessas regiões na variação fenotípica da característica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Como materiais genéticos foram utilizadas 168 famílias F<sub>4</sub> provenientes do cruzamento entre as linhagens endogâmicas L53 e L1327, consideradas como padrões de suscetibilidade e tolerância à toxidez de alumínio, respectivamente. Ambas as linhagens foram desenvolvidas pelo Programa de Melhoramento de Milho da EMBRAPA Milho e Sorgo.

A avaliação fenotípica dos materiais foi realizada em solução nutritiva contendo 6 ppm de Al<sub>3</sub> (Magnavaca, 1982), utilizando o comprimento líquido (CLRS) e o comprimento relativo da raiz seminal (CRRS) como índices fenotípicos para estimar o grau de tolerância e suscetibilidade das famílias. Para isso, foram determinadas as variáveis: comprimento inicial da raiz seminal (CIRS), medido em cada plântula antes da transferência para a solução nutritiva e o comprimento final da raiz seminal (CFRS), medido em cada plântula após 7 dias de cultivo em solução nutritiva. O comprimento líquido da raiz seminal (CLRS) foi determinado pela diferença entre o CFRS e o CIRS de cada plântula, sendo que o comprimento relativo da raiz seminal (CRRS) foi obtido pela divisão do CLRS pelo CIRS. O experimento foi montado em blocos casualizados, onde cada família estava constituída por 3 repetições de 14 plantas, utilizando-se o híbrido simples (L36 x L723), suscetível ao alumínio como testemunha. A análise de variância dos dados fenotípicos, assim como as estimativas dos componentes de variância e herdabilidade, foram calculadas com o auxílio do programa GENES (Cruz, 1997).

Para a avaliação molecular, o DNA das 168 famílias foi extraído conforme o método descrito por Saghai-Marooof *et al.* (1984), sendo quantificado em espectrofotômetro e em géis de agarose (0,8%) pela comparação com padrões de concentração conhecida. Os *bulks* foram constituídos pelo agrupamento do DNA das cinco plantas mais suscetíveis e das cinco mais tolerantes dentro da população F<sub>4</sub>.

Inicialmente, 228 *primers* SSR distribuídos ao longo de todo o genoma de milho foram avaliados entre as linhagens parentais L53 e L1327, o F<sub>1</sub> e os dois *bulks* de DNA para a seleção dos polimorfismos de interesse. Os *primers* foram adquiridos da Research Genetics, Inc., cujas seqüências estão publicamente disponíveis no *Maize Genome Database* (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.htm>). As reações de PCR consistiram de 25 ng de DNA, 0,6 µM de cada *primer*, 100 µM de cada dNTP, 10mM Tris-HCl (pH 8.6), 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1U da enzima Taq polimerase em um volume total de 10 µl. As amplificações foram realizadas no termociclador Perkin Elmer 9600 com uma etapa de 95°C/2min, seguida de um ciclo de 94°C/20sec, 68°C/20sec, 72°C/20sec com a redução da temperatura de anelamento de 1°C a cada ciclo por 9 ciclos até atingir 60°C, seguindo por mais 25 ciclos com a temperatura de anelamento de 60°C e uma etapa final de 72°C/5 min. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 4% e visualizados sob luz ultra-violeta em presença de brometo de etídio.

Os *primers* que geraram polimorfismo de interesse foram utilizados para genotipar as 168 famílias F<sub>4</sub> e os dados moleculares foram associados com as médias dos índices fenotípicos CLRS e CRRS de cada família por meio de análises de regressão simples e múltipla, obtendo-se a porcentagem da variação fenotípica explicada pelos marcadores e seus efeitos na média da população segregante.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância para o CLRS e CRRS demonstraram a existência de variabilidade genética para a tolerância ao alumínio entre as famílias avaliadas (Tabela 1). As estimativas de variância genética aditiva foram superiores à variância genética residual para os dois índices fenotípicos avaliados, indicando serem parâmetros confiáveis na discriminação das famílias, em concordância com os resultados de Martins *et al.* (1999).

**Tabela 1** - Resultado das análises de variância, das estimativas dos componentes de variância e da herdabilidade ao nível de médias de famílias para os índices fenotípicos Comprimento Líquido da Raiz Seminal (CLRS) e Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS)

Fonte de Variação	G.L.	Q.M.	
		CLRS	CRRS
Blocos	2	119,0498	0,0721
Famílias	167	362,7524 **	10,1307 **
Entre parcelas	334	10,1205	0,3998
Dentro parcelas	6.552	4,6507	0,1931
Total	7.055		
Variância genética aditiva		1,3993	0,0386
Variância residual		0,3907	0,0148
Herdabilidade ( $h^2$ )		0,9721	0,9605
Coefficiente de variação genotípica ( $CV_g$ )		30,2627	33,5003
Coefficiente de variação experimental ( $CV_e$ )		6,5282	8,4561
$CV_g / CV_e$		4,6357	3,9617
Média		9,5748	1,4368

\*\* : significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

As estimativas de herdabilidade ao nível de média de famílias ( $h^2$ ) foram elevadas, sendo de 97,21% para CLRS e de 96,05% para CRRS. Tais resultados confirmam a existência de variabilidade genética entre as famílias e comprovam a confiabilidade dos índices CLRS e CRRS para discriminação dos indivíduos quanto à tolerância ao alumínio, além de sugerir que a tolerância ao alumínio pode não ser uma característica muito complexa. Tanto as estimativas de herdabilidade quanto as de variância genética aditiva foram superiores para a variável CLRS, indicando ser o índice mais apropriado para a seleção de famílias em programas de melhoramento genético e para as análises de QTLs visando a tolerância ao alumínio em milho.

A razão entre o coeficiente de variação genotípica e o coeficiente de variação experimental ( $CV_g/CV_e$ ) foi bem superior à unidade (4,6357 para CLRS e 3,917 para CRRS) demonstrando a grande precisão na avaliação destas características e indicando uma situação

muito favorável para a seleção segundo Vencovsky (1987).

Dentre os 228 *primers* SSR avaliados entre os parentais e os *bulks*, apenas quatro apresentaram padrões de amplificação que sugeriam uma associação entre os marcadores e a característica, dentre eles os *primers* bnlg 161, bnlg 238 e phi 126, localizados na extremidade do braço curto do cromossomo 6, e bnlg 165, mapeado no cromossomo 1, na posição 1,07. O padrão de amplificação das 168 famílias F<sub>4</sub> pelos *primers* selecionados foi associado aos índices fenotípicos para avaliação da tolerância ao alumínio.

Por meio da análise de regressão simples, foram obtidos coeficientes de determinação altamente significativos para todos os marcadores quando associados a ambos os índices fenotípicos (Tabela 2). O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido para cada associação indica a proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador e o coeficiente de regressão representa o efeito de cada marcador na média da característica. Como pode ser visto na Tabela 2, todos os coeficientes foram superiores para o índice CLRS, confirmando a superioridade desse índice para a avaliação fenotípica da tolerância ao alumínio.

**Tabela 2** - Análise de regressão simples indicando a associação de marcadores SSR com a tolerância ao alumínio para os índices fenotípicos Comprimento Líquido da Raiz Seminal (CLRS) e Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS).

Locus SSR	Cromossomo	Bin	CLRS		CRRS	
			R <sup>2</sup> (%)	Coef. Regressão	R <sup>2</sup> (%)	Coef. Regressão
bnlg 615	1	1,07	13,72	1,28*** ± 0,24	4,64	0,12** ± 0,04
bnlg 161	6	6,00	26,78	1,86*** ± 0,24	17,29	0,25*** ± 0,04
bnlg 238	6	6,00	25,38	1,81*** ± 0,24	15,67	0,24*** ± 0,04
phi 126	6	6,00	25,70	1,81*** ± 0,24	14,21	0,23*** ± 0,04

\*\* , \*\*\*: probabilidade  $p < 0,001$  e  $0,0001$ , respectivamente

*bin*: intervalos entre dois marcadores fixos definidos ao longo dos cromossomos.

R<sup>2</sup>: indica a porcentagem da variância fenotípica explicada por cada marcador

Coefficiente de regressão: representa o efeito de cada marcador na média da característica

Os quatro marcadores que foram significativamente associados com os índices fenotípicos, foram submetidos a uma análise de regressão múltipla, sendo mantidos no modelo apenas os marcadores bnlg 615 e bnlg 161 (Tabela 3). Ambos os marcadores explicaram 33,96% da variação fenotípica observada para CLRS e 18,5% para CRRS. A eliminação dos marcadores bnlg 238 e phi 126 do modelo de regressão múltipla ocorreu em função de estarem mapeados próximos ao bnlg 161, *bin* 6,00, representando uma mesma região genômica. Tais resultados indicam a existência de pelo menos duas regiões genômicas associados com a tolerância ao alumínio na população avaliada, uma no cromossomo 1, na posição 1,07 e outra na extremidade do braço curto do cromossomo 6. Um QTL para a tolerância ao alumínio denominado *Alm2* foi também mapeado na extremidade do braço curto do cromossomo 6 a 18,5 cM da sonda CSU 70 (Sibov et al., 1999), concordando com os resultados obtidos.

**Tabela 3** - Marcadores SSR associados com a tolerância ao alumínio por meio da análise de regressão múltipla, para os índices fenotípicos Comprimento Líquido da Raiz Seminal (CLRS) e Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS).

Locus	Cromossomo	Bin	CLRS		CRRS	
			F	R <sup>2</sup> (%)	F	R <sup>2</sup> (%)
bnlg 615	1	1,07	19,03***	33,96	3,47*	18,50
bnlg 161	6	6,00	51,84***		30,40***	

\*,\*\*\*: probabilidade  $p < 0,01$  e  $0,0001$ , respectivamente

R<sup>2</sup>: indica a porcentagem da variância fenotípica explicada conjuntamente pelos marcadores.

## LITERATURA CITADA

CRUZ, C.D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística.**

Viçosa, MG: UFV, 1997. 442p.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** v.44. p.397-401. 1989.

MAGNAVACA, R. Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize. Doctoral thesis, University of Nebraska, Lincoln, NE. 1982.

MARTINS, P.R., PARENTONI, S.N., LOPES, M.A., PAIVA, E. Eficiência de índices fenotípicos de comprimento de raiz seminal na avaliação de plantas individuais de milho quanto à tolerância ao alumínio. **Pesq. Agropec. Bras.** V.34, n.10, 0,1897-1904, 1999.

MARTINS, P.R., PARENTONI, S.N., LOPES, M.A. GUIMARÃES, C.T., PAIVA, E. RFLP markers related to aluminum tolerance in maize. **Euphytica** (submetido), 2000.

PANDEY, S.& GARDNER, C.O. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. **Adv. Agron.**v.48, p.1-87, 1992.

RHUE, R.D., GROGAN, C.O., STOCKMEYER E.W., EVERETT, H.L. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Sci.** v. 18, p. 1063-1067, 1978.

SAGHAI-MAROOF, M.A. *et al.* Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)** n.81, p.8014-18, 1994.

SAIKI, R.K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SIBOV, S.T. *et al.* Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, v.42, n.1-8, 1999.

TORRES, G.A. *et al.* A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, n.3, p.459-65, 1997.

VENCOVSKY, R. Herança Quantitativa. In: PATERNIANI, E. & VIÉGAS, G.P. (Eds.). Melhoramento e Produção de Milho. Fundação Cargill, Campinas, 1987.