

Polimorfismo e Mapeamento Molecular em Genótipos de Milho Divergentes Quanto a Tolerância de Sementes à Alta Temperatura de Secagem

Kalinka, C.P.C.S.; Édila, V.R.V.P.; Cláudia, T.G. e Renzo, G.V.P.

Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Cep. 37.200-000, Caixa postal 37, Lavras-MG. E-mail: kaka@ufla.br; edila@ufla.br; claudia@cnpms.embrapa.br; renzo@ufla.br

Palavras-chave: *Zea mays*, tolerância à secagem, microssatélites, mapeamento genético.

O processo de secagem é uma etapa crítica na produção de sementes de milho, podendo, de um lado, limitar a colheita e, de outro, onerar o custo de produção (Rosa, 2000). Segundo Magari et al. (1997), híbridos de milho que possibilitem uma rápida redução do teor de água das sementes colhidas em espigas são necessários para a redução do custo de produção de pós-colheita, relativos à secagem artificial de sementes. Porém, expor as sementes com altos teores de água a temperaturas elevadas durante a secagem artificial pode resultar na redução da qualidade das mesmas (José, 2003).

Diferentes processos podem conferir proteção durante a secagem das sementes, sendo que o nível de tolerância à dessecação depende do estágio de desenvolvimento da semente. No entanto, José, 2003, sugere a existência de variabilidade genética ligada às taxas secagem das sementes e à tolerância a altas temperaturas de secagem. Porém esse é um processo complexo e pouco compreendido, requerendo estudos mais detalhados para possibilitar sua melhor manipulação genética.

Um dos marcadores que vem sendo largamente utilizado no estudo do genoma de diferentes espécies são os microssatélites, que possuem uma série de vantagens, sendo por isso frequentemente escolhidos para o mapeamento genético em eucariotos (Taramino & Tingey, 1996). O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares (Carneiro & Vieira, 2002). Segundo esses autores, procedimentos como o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), estudos de sintenia e clonagem de genes com base em mapas genéticos passaram a representar complementos importantes a serem considerados em programas de melhoramento em diferentes espécies vegetais.

Nessa pesquisa foi avaliado o nível do polimorfismo de locos de microssatélites assim como mapeado o genoma do milho usando marcadores SSR em famílias segregantes provenientes do cruzamento de linhagens de milho com sementes tolerantes e intolerantes a alta temperatura de secagem.

A pesquisa foi desenvolvida na área experimental e no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG e também no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Foram utilizadas 12 linhagens cedidas pela empresa GeneSeeds – Recursos Genéticos em Milho Ltda, sendo as sementes de seis linhagens previamente classificadas como tolerantes a temperatura de secagem de 45 °C e seis como sensíveis. O grupo das seis linhagens tolerantes foi formado pelas linhagens 30, 42, 40, 86, 65 e 91, designadas pelos números de 1 a 6, respectivamente. Já o grupo das seis linhagens sensíveis foi formado pelas linhagens 50, 57, 43, 41, 74 e 84, designadas pelos números de 7 a 12, respectivamente. Essas sementes, juntamente com as dos 36 híbridos F₁ provenientes dos cruzamentos entre as linhagens contrastantes foram obtidas por José et al. (2004) e utilizadas no presente trabalho.

Para a análise das sementes das 12 linhagens quanto à tolerância a alta temperatura de secagem e também para produção de sementes das progênes F₂ de cada um dos 36 híbridos F₁, foi conduzido experimento de campo entre outubro de 2001 e fevereiro de 2002.

As sementes das progênes F₂ de cada um dos 36 híbridos F₁ permaneceram no campo até aproximadamente 18% de teor de água, quando foram colhidas manualmente em espigas e secadas à sombra até 12% de teor de água. As sementes das linhagens foram colhidas quando apresentavam teor de água de 35% e secadas a 45 °C, usando um secador de acordo com o modelo descrito por Rosa (2000).

Os testes de germinação e envelhecimento acelerado foram realizados de acordo com o trabalho de José et al. (2004), sendo que os resultados da qualidade fisiológica obtidos pelo referido autor juntamente com os obtidos nesse primeiro ensaio, foram usados para selecionar uma população para o estudo de mapeamento.

Um outro ensaio foi instalado nos meses de outubro de 2003 a fevereiro de 2004 visando a seleção de plantas com os extremos de tolerância para compor os grupos segregantes usados na análise de polimorfismo dos marcadores microssatélites. O ensaio foi realizado em duas repetições, totalizando 400 plantas F₂ e 50 para os demais tratamentos. Cada planta foi autofecundada, produzindo sementes da geração F_{2:3}. Cada planta individual foi identificada e foram coletadas folhas que ficaram armazenadas a -80 °C. As sementes foram colhidas quando apresentavam teor de água de 35% e os processos de secagem e avaliação quanto à tolerância à dessecação foram os mesmos descritos anteriormente.

As estimativas dos componentes de variância para os dados de envelhecimento acelerado das sementes das famílias F_{2:3} obtidas na safra 2003 e na safra 2003/2004 foram obtidas a partir das esperanças matemáticas, de acordo com a metodologia descrita por Vencovsky & BARRIGA (1992). Foram estimadas as variâncias genéticas (σ^2_g), fenotípicas (σ^2_f) e da herdabilidade no sentido amplo (h^2_a) entre sementes de famílias F_{2:3} segundo as expressões apresentadas por Knapp et al. (1985). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software genético/estatístico GENES, versão Windows (Cruz, 2004).

Após análise dos resultados do teste de envelhecimento, foram selecionados na população F₂ dois grupos com 10 plantas cada, para cada extremo de tolerante e não tolerante, para a avaliação do polimorfismo entre os *bulks*. Para a avaliação de polimorfismo entre as linhagens foram utilizadas 5 plantas de cada um dos genitores. O DNA foi extraído conforme Lopes (2003) e quantificado em um fluorímetro Hoefffer Scientific TKO100.

Para as análises moleculares com marcadores SSR, inicialmente os primers foram avaliados entre as linhagens parentais e os dois *bulks* contrastantes, visando à seleção dos polimorfismos de interesse. Cada um dos *bulks* foi constituído pela mistura de DNA de folhas de 10 indivíduos da progênie F_{2:3}. Para esse estudo foram utilizados 342 *primers* SSR, sendo que 34 deles foram escolhidos por estarem ligados a genes que possuem funções semelhantes aos genes

diferencialmente expressos entre sementes milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem, segundo Kollipara et al. (2002). Os demais *primers* foram selecionados com o objetivo de cobrir a maior extensão possível do genoma e flanqueando as regiões genômicas de interesse descritas por Kollipara et al. (2002). As seqüências de todos *primers* utilizados estão publicamente disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

As reações de PCR foram realizadas de acordo com Salgado et al. (2006) e os produtos de amplificação foram separados em gel de acrilamida 10% por eletroforese a 200V por 1h. Para revelação dos géis utilizou-se o método de coloração com nitrato de prata, segundo Salgado (2005). As imagens foram captadas pelo sistema Eagle Eye de foto-documentação.

Após avaliação inicial, os *primers* que apresentaram polimorfismo entre as linhagens foram utilizados para genotipagem de 129 indivíduos da população F₂, sendo que os métodos de extração, quantificação, amplificação e visualização do DNA para os demais indivíduos da população F₂ foram os mesmos descritos anteriormente.

Para a análise de ligação dos marcadores, as bandas polimórficas obtidas foram codificados como 0 (alelo proveniente do parental susceptível a alta temperatura de secagem), 1 (indivíduo heterozigoto) e 2 (alelo proveniente do parental tolerante a alta temperatura de secagem). Marcadores com segregação mendeliana 1:2:1 pelo teste qui-quadrado ($P < 0,05$) foram mapeados com LOD $> 2,0$ usando o programa QMOL (Cruz e Chuster, 2004). As distâncias no mapa em centiMorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi (Kosambi, 1944).

A secagem das sementes de milho em espigas à temperatura de 45°C foi eficiente para a discriminação dos materiais quanto à tolerância a alta temperatura de secagem.

O valor estimado para herdabilidade no sentido amplo foi de 98,28%. Considerando que a herdabilidade não é apenas uma propriedade da característica, mas também da população e das condições ambientais a que foram submetidos os indivíduos, pode-se sugerir que houve pouca variação ambiental e, portanto, que a avaliação fenotípica para tolerância de sementes a alta temperatura de secagem utilizando o teste de envelhecimento acelerado apresenta alta eficiência.

Na análise dos marcadores, dos 342 primers testados entre as linhagens e os *bulks* segregantes, 117 (34%) foram polimórficos entre as linhagens progenitoras, 163 (48%) foram monomórficos, 38 (11%) apresentaram produtos de baixa resolução no gel de acrilamida e 24 (7%) não apresentaram produtos de amplificação.

A porcentagem de polimorfismo encontrada pode ser considerada intermediária quando comparada aos valores relatados de 23% por Resende (2004), e 50% por Ogliari (1999). Seis dos marcadores SSRs avaliados ainda não possuem região cromossômica definida, sendo que nenhum desses seis marcadores apresentou locos polimórficos entre as linhagens parentais. Os marcadores testados foram distribuídos em 94 dos 100 bins do genoma do milho, no entanto, os 117 locos SSR polimórficos amostraram 67 bins, sendo que todos os cromossomos apresentaram pelo menos cinco locos polimórficos.

Das 342 seqüências avaliadas nesse estudo, 85 *primers* são derivados de genes, sendo que foram observadas diferenças na análise de polimorfismos entre os marcadores derivados de genes com relação aos demais marcadores. Quando se compara o nível de polimorfismo entre os *primers* SSR localizados em regiões não codificantes e aqueles derivados de genes, existe uma redução de 38% para 24% do polimorfismo. Entre os 85 *primers* derivados de genes, 34 foram escolhidos por estarem ligados a genes cujos produtos de expressão possuem funções semelhantes aos genes expressos diferentemente entre sementes de milho tolerantes e intolerantes

à alta temperatura de secagem no trabalho de Kollipara et al (2002). Esses *primers* apresentaram 26% de polimorfismo.

Segundo Neeraja et al. (2005), os microssatélites derivados de genes possuem um menor conteúdo de informação de polimorfismo quando comparados com os SSRs derivados de regiões 3' e 5' não codificadoras e íntrons. Segundo os autores, tal fato é esperado em regiões codificadoras devido à natureza conservada das seqüências dessas regiões. Entretanto, apesar do menor polimorfismo, esses marcadores podem agregar informações importantes ao mapa, além de apresentarem uma maior probabilidade de transferência entre diferentes espécies (Thiel et al., 2003).

Com relação ao tipo de repetição, 69 marcadores não possuem informações sobre o tipo de repetição, o restante dos microssatélites foi agrupado em cinco classes, de acordo com o tipo de repetição: 141 dinucleotídeos, 64 trinucleotídeos, 32 tetranucleotídeos, 15 penta ou hexanucleotídeos e 21 com repetições imperfeitas.

Foram detectadas diferenças nos níveis de polimorfismos entre as classes de repetições de nucleotídeos dos microssatélites. Os tetranucleotídeos e as repetições imperfeitas apresentaram 34% e 33% de locos polimórficos, sendo que estes valores foram intermediários aos polimorfismos encontrados para os trinucleotídeos (23%) e dinucleotídeos (41%) e penta ou hexanucleotídeos (40%). Essas diferenças foram mais acentuadas com os marcadores com repetições de trinucleotídeos, os quais demonstraram um menor valor de polimorfismos que as demais classes de marcadores. Esse baixo percentual de polimorfismo dos trinucleotídeos em relação às demais classes de nucleotídeos pode explicar em parte, o menor valor de polimorfismo encontrado nos microssatélites derivados de genes, uma vez que essa classe de repetição representa o maior percentual de repetições nucleotídicas encontradas nesses marcadores.

À semelhança dos resultados observados por Resende (2004), nenhum par de *primers* revelou polimorfismo entre os *bulks*. Entre as linhagens, os 117 marcadores polimórficos foram avaliados em 129 indivíduos da safra 2003/2004. Dentre os marcadores polimórficos avaliados, 40 apresentaram problemas de resolução ou ausência de amplificação durante a genotipagem, culminando com a análise de 77 marcadores quanto à sua segregação na população.

Por meio dos testes de aderência das proporções genotípicas ao modelo de segregação mendeliana dos 77 locos polimórficos, 59 apresentaram a segregação mendeliana esperada de 1:2:1, utilizando a proteção de Bonferroni a 5% de probabilidade. Locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação podendo gerar falsos positivos. Assim, é recomendado o descarte dos locos para não comprometer a qualidade do mapa (Yao et al., 1999; Bearzoti, 2000; Liu, 1998 citados por Carneiro & Vieira, 2002). Por essa razão, no presente trabalho, apenas os 59 marcadores com segregação mendeliana foram utilizados na construção do mapa de ligação. Desses, 39 foram agrupados e ordenados, gerando 10 grupos de ligação. No entanto, esses 10 grupos de ligação não estão associados aos cromossomos de milho, uma vez que o cromossomo 6 foi fragmentado em três grupos de ligação e os cromossomos 4 e 10 não foram amostrados no mapa. Com isso, nota-se que os marcadores não foram em número suficiente para saturarem todas as regiões genômicas, gerando um mapa com todos os cromossomos devidamente amostrados. Certamente, o aumento na saturação desse mapa em trabalhos posteriores, resultará em uma cobertura mais representativa de todo o genoma do milho.

O número médio de marcadores por grupo de ligação foi de 3,9, variando de dois a sete marcadores por grupo de ligação. O comprimento médio dos grupos de ligação foi de 50,3 cM,

sendo o menor de 18,3 cM e o maior de 106,2 cM. Os marcadores ligados cobriram 502,7 cM do genoma do milho, com uma média de um marcador a cada 12,9 cM. O menor intervalo entre dois marcadores foi de 9,5 cM e o maior intervalo foi de 33,0 cM. Apesar da falta na amostragem de algumas regiões do genoma, o espaçamento entre marcadores foi adequado às análises de mapeamento por intervalo. Nessas condições, essa metodologia se mostra eficiente, uma vez que o maior benefício do mapeamento por intervalo em relação às marcas simples ocorre, quando os marcadores estão distanciados entre 20 e 35 cM. Para distâncias menores que 20 cM, não existe diferença entre as metodologias, ao passo que para aquelas maiores que 35 cM, nem mesmo o mapeamento por intervalo apresenta-se eficiente (Lander, 1993; Doerge, 1993; citados por Coelho, 2000). A ordem dos marcadores ao longo dos grupos de ligação está perfeitamente de acordo o mapa consenso *IBM neighbors* publicado no *Maize Genomics and Genetics Database* (2005).

- CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v.61, n.2, p.89-100, 2002.
- COELHO, A.S.G. **Considerações gerais sobre a análise de QTL's**. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. Análise de QTL no melhoramento de plantas. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-20.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes – Versão Windows**, aplicativo computacional em genética e estatística. Versão 2004. 2. 1 Viçosa: UFV, 2004.
- JOSÉ, S.C.B.R. **Tolerância à alta temperatura de secagem de sementes de milho**. 2003. 149p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- JOSÉ, S.C.B.R. et al. Tolerância de sementes de linhagens de milho a alta temperatura de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1107-1114, 2004.
- KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Science**, Madison, v. 25, n. 1, p. 192-194, 1985.
- KOLLIPARA, K.P. et al. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.129, p.974-992, 2002.
- KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, Cambridge, v.12, p.172-175, 1944.
- LOPES, M.T.G. **Mapeamento de genes de resistência a mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2003. 117p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- MAGARI, R.; KANG, M.S.; ZHANG, Y. Genotype by environment interaction for ear moisture loss rate in corn. **Crop Science**, Madison, v.37, p.774-779, 1997.
- NEERAJA, C.M. et al. Characterization of tall landraces of rice (*Oryza sativa* L.) using gene-derived simple sequence repeats **Current Science**, v.88, n.1, p.149-153, Jan. 2005
- OGLIARI, J.B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho a *Exserohilum turcicum* (Pass) Leonard & Suggs através do uso de marcadores moleculares microssatélites**. 1999. 114p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- RESENDE, V.F. **Análise genética da resistência à antracnose foliar em milho**. 2004. 103p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

ROSA, S.D.V.F. **Indução de tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho por meio de pré-condicionamento a baixa temperatura.** 2000. 121p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALGADO, K.C.P.C. ; VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R.; GUIMARÃES, C.T.; VON PINHO, R.G.; SOUSA, L.V. Genetic purity certificate in seeds of hybrid maize using molecular markers. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.169-175, 2006.

SALGADO, K.C.P.C. **Mapeamento de QTLs associados à tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de milho.** 2005. 109p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germoplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, v.29, p.277-287, 1996.

THIEL, T. et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare*L.) **Theory Applied Genetic**, v.106, p.411-422, 2003.