

Divergência Molecular Entre Linhagens de Milho Desenvolvidas sob Baixa Disponibilidade de Nitrogênio

Lauro J. M. Guimaraes¹, Ivanildo E. Marriel¹, Paulo E. O. Guimarães¹, Claudia T. Guimarães¹, Sidney N. Parentoni¹, Walter F. Meirelles¹, Cleso A. P. Pacheco¹, Silvia N. Jardim¹, Adelmo R. da Silva¹, Marcelo O. Soares²

¹Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo. CP 285. CEP: 35701-970, Sete Lagoas – MG. guimaraes@cnpms.embrapa.br. ²Estudante de mestrado - UFV. marcelosoares2001@gmail.com

Palavras-chave: *Zea mays* L., eficiência no uso de N, distância genética, SSR, estresse mineral.

Segundo Ribeiro e Ramalho (1999) grande parte das propriedades brasileiras que cultivam milho não promovem adequada fertilização e correção de seus solos, fato também reportado por Atlin e Frey (1889). No Brasil, essa situação ocorre em grande parte das pequenas e médias lavouras de milho conduzidas na safra e em grandes lavouras na safrinha. Neste contexto o nitrogênio é um dos nutrientes que mais limitam a produtividade do milho, pois além de escasso na maioria dos solos o N é exigido em grandes quantidades (França et al., 1986).

A Embrapa Milho e Sorgo vem realizando estudos sobre eficiência de uso de nitrogênio para a cultura do milho visando identificar genótipos mais produtivos em ambientes com estresse por deficiência deste nutriente e, também, identificar materiais genéticos que sejam responsivos à aplicação de doses de N recomendadas na agricultura tecnificada (Gama, 2002; Marriel, 2006. Durães, 2005; Guimarães, 2006).

Um fator fundamental em qualquer programa de melhoramento é a existência de variabilidade no material sob seleção. Guimarães (2006) estudou o comportamento dos híbridos dialélicos de seis linhagens de milho desenvolvidas a partir de uma planta selecionada pela eficiência de uso de N na população CMS-28, entre outros genótipos. Dentre as seis linhagens avaliadas, três foram classificadas como eficientes no uso de N (L1, L2 e L3) e três foram tidas como ineficientes (L4, L5 e L6). O comportamento genético, em termos de efeitos aditivos, foi condizente com a classificação *per se* das linhagens e os híbridos de linhagens eficientes tenderam a ser mais eficientes e mais responsivos que os híbridos das linhagens ineficientes.

Entretanto, muitas questões relativas à eficiência no uso de N ainda são pouco entendidas, sendo necessários novos estudos fisiológicos, morfológicos e moleculares para elucidar melhor as diferenças fenotípicas e genéticas entre os materiais contrastantes na eficiência e resposta ao nitrogênio.

Parte da variabilidade genética existente em nível de DNA pode ser analisada pela utilização de marcadores moleculares. O estudo da diversidade genética entre linhagens desenvolvidas em programas de melhoramento de milho permite agrupá-las de acordo com suas distâncias genéticas ou medidas de dissimilaridade, fornecendo informações importantes para a escolha de parentais de novas populações segregantes e para formação de sintéticos e híbridos.

Os marcadores SSR (Simple Sequence Repeat), também conhecidos como microssatélites, são caracterizados por sequências de DNA com repetições em tandem de um ou mais nucleotídeos. Os microssatélites apresentam-se codominantes e multialélicos e, em milho, estão distribuídos em todo o genoma, sendo que existem milhares de primers desenvolvidos para

esta cultura. Este tipo de marcador é de fácil utilização e de alta repetibilidade entre laboratórios pelo fato de haver alta conservação das regiões genômicas que flaqueiam os locos SSR.

Os microssatélites têm sido utilizados em estudos de diversidade e caracterização de materiais genéticos (Lu & Bernardo, 2001; Padilha, 2002), na construção de mapas genéticos (Taramino & Tingey, 1996) e para seleção assistida por marcadores moleculares (Mesquita, 2005).

O objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade genética-molecular existente, por meio de marcadores microssatélites (SSR), entre as seis linhagens de milho contrastantes no uso de N, citadas anteriormente, e outras duas linhagens-elite do Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa Milho e Sorgo (L7 e L8), sendo uma pertencente ao grupo heterótico dentado e a outra do grupo heterótico “Flint”.

O trabalho foi desenvolvido no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, em janeiro de 2008. Foram semeadas 10 sementes de cada linhagem em vasos conduzidos em casa de vegetação até os 15 dias após a emergência, onde foram coletadas folhas em bulk. Cada bulk foi composto por segmentos de 10 cm de comprimento de folhas de cinco plantas de cada linhagem. Após a coleta as folhas foram embrulhadas em papel alumínio, identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e levadas para o laboratório, onde foram acondicionadas em ultra-freezer, a -80°C , até que fossem utilizadas para extração do DNA.

O isolamento do DNA genômico das plântulas de milho foi realizado segundo a modificação do método descrito por Saghai-Maroofo et al. (1984). As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % (m/v) em tampão TAE, comparando-se com um padrão de DNA de concentração conhecida. O DNA estoque foi diluído em água ultrapura para a concentração de 10 ng/ μL e armazenado a -20°C .

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems), conforme protocolo próprio para amplificação de DNA de milho. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de poliacrilamida 10% sob eletroforese a 150 V por 2,5 horas. O gel foi corado com nitrato de prata e a imagem capturada pelo fotodocumentador Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, USA) sob luz UV.

Foram utilizados 18 primers SSR distribuídos nos 10 cromossomos do milho e, a partir dos resultados das reações de PCR foram observadas 370 bandas nos géis. Deste total, 306 bandas apresentaram-se monomórficas e 64 bandas foram polimórficas e, portanto, informativas. As marcas moleculares consideradas informativas foram organizadas de acordo com os alelos distintos entre os oito genótipos avaliados (Tabela 1) e codificadas como marcadores codominantes. As marcas codificadas foram analisadas através do Programa GENES (Cruz, 2007) para obtenção das distâncias de Rogers (Rogers, 1972). Dentre as 144 informações geradas pela codificação dos 18 marcadores SSR, para as oito linhagens, foram identificadas 135 codificações homozigotas e 9 heterozigotas.

Foi gerado um dendrograma pela técnica UPGMA (Figura 1), também utilizando-se o Programa GENES (Cruz, 2007), a partir dos quadrados das distâncias de Rogers obtidas entre todos os pares de linhagens (Tabela 2).

A correlação confenética é uma estatística associada à formação das ramificações de uma árvore de diversidade e relaciona os valores das distâncias da matriz original com os valores da matriz de distâncias gráficas, sendo que valores acima de 0,80 podem ser considerados altos e refletem boa confiança na formação do dendrograma.

Neste trabalho, o valor estimado para a correlação cofenética foi de 0,90 e foi obtida uma estimativa de distorção de apenas 3,04%. Além disso, a estatística t, relacionada à significância dos pontos de corte formadores de novas ramificações do dendrograma construído pelo método hierárquico, foi significativa a 1% de probabilidade. Desta forma, verifica-se que a formação dos grupos, a partir das informações genéticas geradas pelos 18 primers microssatélites, foi consistente e permitiu a distinção entre materiais selecionados de modo divergente, além de alocar em grupos diferentes as duas linhagens testemunhas.

Tabela 1 - Distribuição de alelos por loco microssatélite, entre as oito linhagens avaliadas

Marcador	Identificação do marcador	Descrição dos alelos	N.alelos
1	bnlg1006	1 2 3	3
2	bnlg125	1	1
3	bnlg1338	1 2 3	3
4	bnlg161	1 2 3 4 5	5
5	bnlg182	1 2 3 4	4
6	bnlg1863	1 2 3 4 5 6	6
7	bnlg2241	1 2 3 4 5	5
8	dupssr14	1 2 3 4	4
9	dupssr24	1 2 3 4	4
10	phi084	1 2 3 4 5	5
11	umc1008	1 2 3	3
12	umc1016	1 2 3 4	4
13	umc1019	1 2 3	3
14	umc1033	1 2 3 4 5	5
15	umc1084	1 2	2
16	umc1653	1 2	2
17	umc1771	1 2	2
18	umc1862	1 2 3	3
Total de alelos:			64

No processo de agrupamento hierárquico, pela técnica UPGMA, foi possível verificar a formação de três grupos de linhagens (G1, G2 e G3), sendo estes consistentes com as informações prévias de origem (Figura 1).

As linhagens 2, 3 e 1, que são previamente classificadas como eficientes no uso de nitrogênio, por suas performances em experimentos com deficiência de N, foram reunidas em uma mesma ramificação e no dendrograma, formando o no grupo 1 (G1), sendo possível verificar a estreita relação genética entre estes genótipos.

O segundo grupo (G2) foi formado pelas três linhagens ineficientes no uso de N, sendo as linhagens 5 e 6 apresentaram-se bem similares, enquanto a linhagem 4 foi alocada em uma ramificação intermediária entre as ineficientes e as eficientes no uso de N (Figura 1).

Já o terceiro grupo (G3) foi formado pelas duas linhagens-elite do Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa, sendo que elas mostraram-se bem divergentes das linhagens derivadas da população CMS 28 e também entre si. A linhagem 7 é representante do grupo heterótico “Dent”, apresenta grãos amarelos e do tipo dentado, enquanto a linhagem 8 é tipicamente pertencente ao grupo heterótico “Flint”, apresentando grãos duros e bem alaranjados.

Estas duas linhagens do grupo elite representam testemunhas externas para comparações mais adequadas das distâncias entre as linhagens derivadas da populações CMS 28 (Figura 1).

Tabela 2 - Distâncias de Rogers (D_{ij}) e Quadrado da Distância de Rogers (D_{ij}^2), entre os pares de linhagens i e j

Linhagem i	Linhagem j	Distância de Rogers (D_{ij})	Quadrado da Distância de Rogers (D_{ij}^2)
1	2	0,437	0,191
1	3	0,409	0,167
1	4	0,611	0,373
1	5	0,604	0,364
1	6	0,750	0,563
1	7	0,922	0,850
1	8	0,778	0,605
2	3	0,270	0,073
2	4	0,589	0,347
2	5	0,526	0,276
2	6	0,561	0,315
2	7	0,900	0,810
2	8	0,680	0,462
3	4	0,596	0,355
3	5	0,644	0,415
3	6	0,680	0,462
3	7	0,852	0,725
3	8	0,798	0,637
4	5	0,715	0,511
4	6	0,881	0,777
4	7	0,867	0,751
4	8	0,667	0,444
5	6	0,465	0,216
5	7	0,859	0,738
5	8	0,826	0,682
6	7	0,970	0,941
6	8	0,770	0,593
7	8	0,846	0,716

Além da identificação de linhagens e cultivares que apresentem comportamentos agrônômicos adequados para as situações de estresse quanto à deficiência de N e sem estresse, busca-se, na Embrapa Milho e Sorgo, o entendimento de mecanismos fisiológicos, morfológicos e moleculares relacionados à eficiência de uso de N e à resposta dos genótipos à aplicação do nutriente. Neste estudo, pode-se concluir que as linhagens com características fenotípicas e genéticas contrastantes, tais como eficiência no uso de nitrogênio e grupo heterótico, foram agrupadas em clusters distintos. Este fato permite inferir que existe suficiente divergência genética entre as linhagens derivadas da população CMS 28, selecionadas de modo contrastante, para que estas sejam usadas como parentais para formação de populações de mapeamento e outros estudos genéticos e fisiológicos visando elucidar fatores relacionados à eficiência de uso de N e à resposta à aplicação deste nutriente em altas doses.

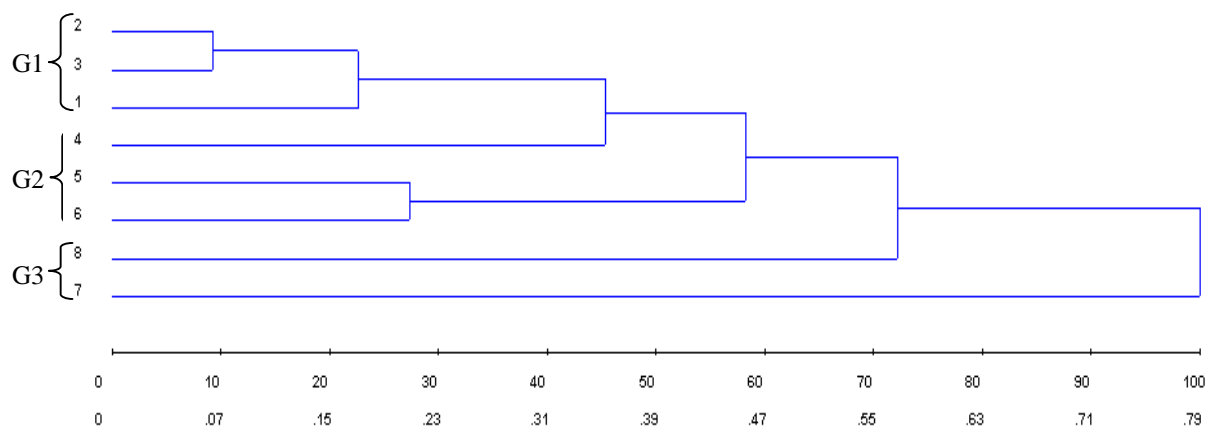


Figura 1 - Dendrograma de distâncias e grupos de linhagens mais similares: (G1: eficientes no uso de N; G2: ineficientes no uso de N; e, G3: linhagens-elite do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo).

Referências bibliográficas

ATLIN, G.N.; FREY, K.J. Breeding crop varieties for low-input agriculture. **American Journal of Alternative Agriculture**, v.4, n.2, p. 53-58, 1989.

CRUZ, C. D. Programa GENES: **Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa, MG. UFV. 2007.

DURÃES, F.O.M, MARRIEL, I.E., GAMA, E.E.G., OLIVEIRA, A.C. E CANTÃO, F.RO. Caracterização de Genótipos de Milho para Uso e Eficiência de Nitrogênio. **Comunicado Técnico 128. Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas - MG. 2005.

FRANÇA, G.E. DE; BAHIA FILHO, A.F.C.; VASCONCELOS, C.A.; SANTOS, H.L. Adubação no Estado de Minas Gerais. In: Santana, M.B.M.. **Adubação nitrogenada no Brasil**. Ilhéus: CEPLAC, SBSC, p.107-124. 1986.

GAMA, E.E.G., MARRIEL, I.E., GUIMARÃES, P.E.O., et al. Combining ability for nitrogen use in a selected set of inbred lines from a tropical maize population. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.3, p.68-77, 2002.

GUIMARÃES, L.J.M. **Caracterização de genótipos de milho desenvolvidos sob estresse de nitrogênio e herança da eficiência de uso deste nutriente**. Tese de Doutorado. UFV – Viçosa MG. 2006.

LU, H., AND R. BERNARDO. 2001. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds. **Theor. Appl. Genet.** 103:613–617.

MARRIEL, I.E. et al. Caracterização de linhagens S4 da população de milho CMS 28, contrastantes para eficiência no uso de nitrogênio, quanto a responsividade à adubação nitrogenada. **XXVI CNMS**. Belo Horizonte – MG. 2006.

MESQUITA, A.G.G., GUIMARÃES, C.T., et al. Recuperação do genitor recorrente em milho utilizando retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.3, p.275-285, 2005

PADILHA, L. **Marcadores moleculares semiautomatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 f. Tese de Doutorado – UFLA. Lavras – MG. 2002.

RIBEIRO, P. H. E.; RAMALHO, M.VER P. R.; FERREIRA, D. F. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho em diferentes condições ambientais do estado de Minas Gerais. In: **Reunião Latinoamericana Del Maíz**, 18. 1999. Sete Lagoas – MG. Memórias..., Sete Lagoas –Embrapa – CNPMS/CIMMYT, 1999. 684 p.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. **Studies in genetics VII**. Univ. of Tex. Publ. 7213:145-153. 1972.

TARAMINO, G. AND TINGEY, S.. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, 39: 277–287. 1996.