

Análise de trilha para carotenoides em milho

RIOS, S.A.⁽¹⁾, BORÉM, A.⁽¹⁾, GUIMARÃES, P.E.O.⁽²⁾ e PAES, M.C.D.⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitotecnia, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brazil. E-mail: sararioss@yahoo.com.br; borem@ufv.br. ⁽²⁾ Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: evaristo@cnpmc.embrapa.br; mcdpaes@cnpmc.embrapa.br

Palavras-chave: *Zea mays*, carotenoides, correlações, análise de trilha.

1. Introdução

O conhecimento da relação linear entre caracteres, nas fases iniciais de um programa de melhoramento, é de grande importância principalmente em casos onde a característica de interesse apresenta baixa herdabilidade e difícil mensuração e identificação, entre outros. A utilização, portanto, de seleção indireta por resposta correlacionada pode permitir maior eficiência e progresso na seleção. Cardoso et al. (2009) relataram altas correlações significativas entre carotenoides totais e carotenos e xantofilas. E, considerando a influência das xantofilas na coloração alaranjada dos grãos de milho, poder-se-ia esperar que a seleção fenotípica com base nesta coloração fosse eficiente para obtenção de genótipos com elevados teores desses carotenoides nos grãos. Porém, Harjes et al. (2008) reportaram baixas correlações entre carotenoides totais e cor dos grãos, indicando que a seleção assistida por marcadores seria mais eficiente. No entanto, os valores de correlações, ainda que sejam considerados os aspectos de magnitude, significância e significado, não garantem uma relação de causa e efeito entre os caracteres, podendo levar a erros na sua interpretação.

A análise de trilha, desenvolvida por Wright (1921) permite o desdobramento das correlações fenotípicas em efeitos diretos e indiretos dos caracteres sobre uma variável principal, o que permite maior confiabilidade na escolha dos caracteres para seleção. A mensuração dos efeitos diretos e indiretos é dependente do conjunto de caracteres estudados, que normalmente é estabelecido pelo conhecimento prévio do pesquisador de sua importância e de possíveis inter-relações expressas em diagramas de trilha (CRUZ e REGAZZI, 1997). No desdobramento de um conjunto de caracteres sobre uma variável básica faz-se necessário estimar coeficientes de trilha, obtidos por meio de equações de regressão em que as variáveis são previamente padronizadas. O conhecimento dos efeitos diretos e indiretos que uma variável principal responde pelas demais explicativas é que permite decidir, durante a fase de seleção do programa de melhoramento, qual estratégia será mais eficiente, se a resposta correlacionada ou a utilização de índices de seleção.

Santos, Senalik e Simon (2005) foram os primeiros a avaliar as inter-relações entre produtos em uma via biossintética, trabalhando com a análise de trilha para carotenoides em cenoura e concluíram que este desdobramento além de auxiliar na identificação de pontos da rota metabólica, que limitam o acúmulo de carotenoides, auxilia no entendimento da evolução desta rota de biossíntese. Considerando escassas as informações desta natureza na literatura científica para a cultura do milho, o objetivo deste trabalho foi desdobrar as correlações fenotípicas entre carotenoides e produtividade, em efeitos diretos e indiretos, por meio da análise de trilha.

2. Material e métodos

Foram utilizados dados obtidos do Ensaio Nacional de Variedades de Milho conduzido pela Embrapa Milho e Sorgo, no ano agrícola 2004/2005. Foram avaliados três ambientes distintos quanto ao nível de fertilidade do solo (Tabela 1), no município de Sete



Lagoas/MG: o primeiro ambiente caracterizado por solo fértil; o segundo ambiente onde foi feita adubação com altos níveis de nitrogênio (120 kg.ha⁻¹: 20 kg no plantio e 100 kg em cobertura) e o terceiro, com adubação utilizando-se baixos níveis de nitrogênio (20 kg.ha⁻¹ no plantio). Os outros dois ambientes de avaliação localizaram-se nos municípios de Planaltina e Goiânia, no estado de Goiás, com diferentes altitudes, 1000 e 823 m, respectivamente (Tabela 1). A descrição dos 10 cultivares, suas origens, além de outras características, encontra-se na Tabela 2.

As parcelas foram constituídas de duas fileiras de quatro metros, com espaçamento de 0,90 m entre linhas e estande final de aproximadamente 55.000 plantas por hectare.

Tabela 1: Fertilidade dos solos para quatro dos cinco ambientes de avaliação caracterizados como Fértil, Alto N (120 kg.ha⁻¹: 20 kg no plantio e 100 kg em cobertura), Baixo N (20 kg.ha⁻¹ no plantio) e Planaltina

Local	Ambiente	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Cu	Zn	Fe	Mn
		(água)	g/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	cmolc/dm ³	cmolc/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³	mg/dm ³
Sete Lagoas/MG	Fértil	5,8	21	6,7	120	2,88	1,07	5,06	2,1	4,8	41	62
	Alto N	6,1	3,75	10	126	4,62	0,87	4,39	1	3,87	45,2	25,2
	Baixo N	6,2	3,47	8	110	4,18	0,84	4,05	2,97	4,5	46,1	25,1
Planaltina/DF		5,5	3,2	12,5	85	2,4	0,5	4,02	-	-	-	-

As análises foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos e Forragens do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, localizado em Sete Lagoas, MG, utilizando-se delineamento em blocos casualizados, com 10 cultivares de milho em cinco ambientes de avaliação, com duas repetições.

A debulha foi feita em debulhador mecânico, moendo-se os grãos obtidos em micro moinho, tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba – SP), com posterior acondicionamento das amostras em frascos de vidro, tampados, lacrados com parafilme e envoltos em papel alumínio. Estes foram armazenados à temperatura de -20° C até condução das análises químicas.

Tabela 2: Caracterização dos cultivares de milho quanto à procedência, tipo de grão e população

Cultivares	Procedência	Tipo e coloração dos grãos	População
BRS 2020	Embrapa	Semiduro/alaranjado	Híbrido Duplo
Fundacep 35	Fundacep	Semiduro/amarelo-alaranjado	Variedade
CMS 104	Embrapa	Semidentado/amarelo	População
BRS Caatingueiro	Embrapa	Semiduro/amarelo	Variedade
BRS 473 cIII	Embrapa	Semiduro/amarelo-alaranjado	Variedade
UFVM100	UFV	Dentado/amarelo-alaranjado	Variedade
CMS 102	Embrapa	Semidentado/amarelo	População
CMS 101	Embrapa	Semidentado/amarelo	População
BRS Missões	Embrapa	Dentado/amarelo	Variedade
BRS São Francisco	Embrapa	Semidentado/amarelo-alaranjado	Variedade



As extrações foram realizadas segundo protocolo descrito por Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), com posterior quantificação de carotenoides totais (CT) em espectrofotômetro Cary 50 Conc UV-Visible (VARIAN - Austrália). Carotenos (α e β -carotenos) e xantofilas luteína, zeaxantina e β -criptoxantina foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 equipado com coluna polimérica YMC C 30 ($5\mu\text{m}$, $4,6 \times 250\text{mm}$, Waters, Milford, MA, USA), acoplado a detector de arranjo de diodo. O gradiente de eluição foi conduzido a $0,8\text{mL min}^{-1}$ em condições de gradiente linear 80:20 a 15:85 de metanol: éter metil *tert*-butil em 25 minutos, seguido por constante de 80:20 em 5 minutos, finalizando com 6 minutos de equilíbrio. A temperatura do laboratório foi mantida a 22°C durante todo o processo. Para identificação dos compostos foram utilizados padrões purificados a partir de cenoura e milho verde, seguindo protocolo descrito em Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Os resultados foram expressos em base seca, por meio da análise de umidade realizada nas amostras, em duplicata, seguindo o método 44-15A da AACC (2000).

Foram estimados os coeficientes de correlações fenotípicas, genotípicas e ambientais entre as variáveis utilizando-se os 10 cultivares e a média dos 5 ambientes. A análise de trilha foi realizada após o diagnóstico de multicolinearidade na matriz de correlações fenotípicas. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Genes, Cruz (1998).

3. Resultados e discussão

Os caracteres de maior contribuição para elevar os teores de β -caroteno, com base no estudo de correlações simples, são CT, zeaxantina e β -criptoxantina (dados não apresentados).

O diagnóstico de multicolinearidade revelou que das 21 correlações analisadas, 4 delas apresentaram valor absoluto maior que 0,80; 4 números de fatores de inflação da variância (VIF) superiores a 10 e número de condição (NF) maior do que 1000, caracterizando existência de colinearidade severa. Este resultado não inviabiliza a realização da análise de trilha, uma vez que já existem metodologias apropriadas para estudo de efeitos diretos e indiretos sob multicolinearidade (CARVALHO, 1995; CARVALHO et al., 1999; COIMBRA et al., 2005). Logo, utilizou-se a metodologia proposta por Carvalho (1995), denominada análise de trilha em crista, para estimação dos parâmetros como forma alternativa à metodologia dos quadrados mínimos. A constante k adicionada à diagonal da matriz $X'X$ foi determinada pelo exame do traço da crista, por meio da construção de um gráfico onde foram plotados os coeficientes de trilha em função dos valores de k no intervalo de $0 < k < 1$.

O resultado da análise de trilha de β -caroteno em função das variáveis explicativas CT, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e produtividade é apresentado na Tabela 2, com um valor de k de 0,0497. O coeficiente de determinação do modelo de análise de trilha (R^2) foi igual a 0,8364, caracterizando que 83,64% da variação da variável dependente β -caroteno no modelo, estão sendo explicados pelas variáveis utilizadas no diagrama causal.

Tabela 2. Estimativas dos efeitos diretos e indiretos envolvendo a variável principal dependente β -caroteno e as independentes explicativas: carotenoides totais, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno e produtividade

CAROTENOIDES TOTAIS	Estimativa	VIF
Efeito direto sobre β -caroteno	-0,0132	3,5128
Efeito indireto via luteína	-0,1011	0,3406
Efeito indireto via zeaxantina	0,6660	5,7796
Efeito indireto via β -criptoxantina	0,1873	3,7334



Efeito indireto via α -caroteno	0,0105	0,2257
Efeito indireto via produtividade	-0,0177	0,0229
Total		0,7311*
LUTEÍNA		
Efeito direto sobre β -caroteno	0,3406	4,2596
Efeito indireto via carotenoides totais	0,0039	0,2809
Efeito indireto via zeaxantina	-0,6721	5,8850
Efeito indireto via β -criptoxantina	-0,0962	0,9836
Efeito indireto via α -caroteno	-0,0252	1,2929
Efeito indireto via produtividade	0,0310	0,0708
Total		-0,4009
ZEAXANTINA		
Efeito direto sobre β -caroteno	0,8818	11,1635
Efeito indireto via carotenoides totais	-0,0100	1,8187
Efeito indireto via luteína	-0,2596	2,2455
Efeito indireto via β -criptoxantina	0,2029	4,3797
Efeito indireto via α -caroteno	0,0253	1,3054
Efeito indireto via produtividade	-0,0286	0,0603
Total		0,8555**
B-CRIPTOXANTINA		
Efeito direto sobre β -caroteno	0,2310	6,2580
Efeito indireto via carotenoides totais	-0,0107	2,0957
Efeito indireto via luteína	-0,1418	0,6695
Efeito indireto via zeaxantina	0,7744	7,8129
Efeito indireto via α -caroteno	0,0220	0,9869
Efeito indireto via produtividade	-0,0082	0,0049
Total		0,8778**
α - CAROTENO		
Efeito direto sobre β -caroteno	0,0377	3,2052
Efeito indireto via carotenoides totais	-0,0037	0,2474
Efeito indireto via luteína	-0,2271	1,7182
Efeito indireto via zeaxantina	0,5907	4,5467
Efeito indireto via β -criptoxantina	0,1346	1,9269
Efeito indireto via produtividade	0,0292	0,0626
Total		0,5631
PRODUTIVIDADE		
Efeito direto sobre β -caroteno	0,1362	1,5036
Efeito indireto via carotenoides totais	0,0017	0,0536
Efeito indireto via luteína	0,0776	0,2006
Efeito indireto via zeaxantina	-0,1854	0,4478
Efeito indireto via β -criptoxantina	-0,0139	0,0204
Efeito indireto via α -caroteno	0,0081	0,1335
Total		0,0313
Coefficiente de determinação		0,8364
Valor de k usado na análise		0,0497
Efeito da variável residual		0,4044

**,*: Significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade, pelo teste t;



Apesar de o estudo de correlações simples ter apontado como caracteres de maior contribuição para elevar os teores de β -caroteno, as variáveis CT, zeaxantina e β -criptoxantina (dados não apresentados), a existência de alta correlação entre β -caroteno e as variáveis CT (0,73) e β -criptoxantina (0,88) não significa relação de causa e efeito entre estas variáveis, ou seja, a seleção de genótipos com altos teores de β -caroteno por resposta indireta por CT, por exemplo, não seria eficiente considerando que a zeaxantina é que tem efeito direto elevado sobre β -caroteno. Logo, a utilização da seleção simultânea de caracteres por meio de índices de seleção apropriados seria mais vantajosa e segura.

A variável que apresentou o maior efeito direto sobre β -caroteno foi a zeaxantina (0,88) e a correlação simples entre estas variáveis também foi elevada (0,85) o que caracteriza um efeito pronunciado da zeaxantina sobre o teor de β -caroteno. Este resultado já era esperado uma vez que pela rota de biossíntese de carotenoides, a zeaxantina é o produto da hidroxilação do β -caroteno (HOWITT e POGSON, 2006). Confirma-se, portanto, a necessidade em se realizar a varredura de genótipos promissores quanto ao teor de β -caroteno por meio da análise das frações de carotenoides, pois só a análise de CT não é suficiente, já que os resultados das correlações e posteriores desdobramentos não foram favoráveis à resposta correlacionada.

4. Conclusões

1. Apenas a variável zeaxantina apresentou alta correlação e alto efeito direto sobre β -caroteno;
2. O *screening* de genótipos promissores quanto ao teor de β -caroteno deve levar em conta todas as demais frações de carotenoides, pois só a análise de CT não é suficiente para discriminar os melhores genótipos;
3. A seleção de genótipos com altos teores de β -caroteno pode ser realizada por meio da utilização de índices de seleção apropriados, já que também é vantajosa a seleção de genótipos ricos em outras frações de carotenoides.

5. Referências

AACC. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods, 10. ed. St. Paul: AACC, 2000.

CARDOSO, W.S.; PAES, M. C. D.; GALVÃO, J. C. C.; RIOS, S. A.; GUIMARÃES, P.E.O.; SCHAFFERT, R.E.; BORÉM, A. Variabilidade de genótipos de milho quanto à composição de carotenoides nos grãos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 44, n.2, p. 164-173, 2009.

CARVALHO, C. G. P. de; OLIVEIRA, V. R.; CRUZ, C. D.; CASALI, V. W. D. Análise de trilha sob multicolinearidade em pimentão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol.34, n.4, p. 603-613, 1999.

CARVALHO, S.P. de. Métodos alternativos de estimação de coeficientes de trilha e índices de seleção, sob multicolinearidade. Viçosa: UFV, 1995. 163p.



COIMBRA, J.L.M.; BENIN, G.; VIEIRA, E.A.; OLIVEIRA, A.C. de.; CARVALHO, F.I.F.; GUIDOLIN, A.F.; SOARES, A.P. Consequências da multicolinearidade sobre a análise de trilha em canola. *Ciência Rural*, v.35, n.2, p. 347-352, 2005.

CRUZ, C.D. Genes - Software for experimental statistics in genetics. *Genet Mol Biol* 21:135-138, 1998.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético. Editora UFV, Vicosa, 1997, 390 pp.

HARJES, C.E.; ROCHEFORD, T.R., BAI, L.; BRUTNELL, T. et al. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science*, v. 319, p. 330-333, 2008.

HOWITT, C.A.; POGSON, B.J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment*. v.29, p. 435-445, 2006.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Washington, DC and Cali: IFPRI and CIAT, 2004. 58p. (HarvestPlus Technical Monograph, 2).

SANTOS, C. A. F.; SENALIK, D.; SIMON, P. W. Path analysis suggests phytoene accumulation is the key step limiting the carotenoid pathway in white carrot roots. *Genetics and Molecular Biology*. v.28, n.2, p. 287-293, 2005.

WRIGHT, S. Correlation and causation. *Journal of Agricultural Research*, v. 20, p.557-585, 1921.

