

Análise da Diversidade Genética Entre Acessos de Milho Tolerantes a Baixos Níveis de Nitrogênio e Fósforo Utilizando Marcadores Moleculares Microssatélites

Gustavo César Sant'Ana¹, Eder Christian Malta de Lanes², Glauco V. Miranda³, Juliano Lino Ferreira⁴
Aluizio Borem⁵, Roberto Fritsche-Neto⁶

Resumo

O desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições de estresse causado por baixos níveis de N e P apresenta-se como uma opção economicamente viável e ecologicamente sustentável para garantir maior produtividade em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 14 acessos de milho, sendo 7 tolerantes a baixos níveis de nitrogênio e 7 tolerantes a baixos níveis de fósforo. Foi observado um total de 299 alelos, com o número de alelos por loco variando de 1 a 8, com uma média de 3,6875. Todos os acessos se mostraram homozigotos em relação a todos os locos analisados. A matriz de dissimilaridade genética evidenciou a existência de um razoável **nível de variabilidade genética entre as** linhagens. A dissimilaridade genética variou de 0,3551 (entre 7 e 8) a 0,6885 (entre 1 e 7) com média igual a 0,5424. A análise de agrupamento evidenciou a formação de 3 grupos, um constituído por duas linhagens tolerantes a baixos níveis de N (11 e 12), o segundo formado por 4 linhagens tolerantes a baixos níveis de P (3, 5, 6 e 7) e duas a baixos níveis de N (8 e 13) e o terceiro formado por 3 linhagens tolerantes a baixos níveis de P (1, 2 e 4) e 3 a baixos níveis de N (9, 10 e 14). Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser úteis para o planejamento de cruzamentos entre genitores com níveis desejados de divergência genética, no sentido de contribuir para o melhoramento simultâneo para tolerância a baixos níveis de N e a baixos níveis de P.

Introdução

O desenvolvimento de variedades de milho tolerantes a diversos tipos de estresses abióticos é importante para a ampliação da produção e das áreas de cultivo desse importante cereal. Entre os diversos tipos de estresses abióticos, a deficiência de nitrogênio (N) e de fósforo (P) são comuns nos solos brasileiros, afetando negativamente o desenvolvimento das plantas e levando a redução da produtividade. O desenvolvimento de cultivares adaptadas às condições de estresse causado por baixos níveis de N e P apresenta-se como uma opção economicamente viável e ecologicamente sustentável para garantir maior produtividade em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos (SOUZA et al 2008).

O fósforo é um nutriente limitante em várias regiões do mundo, principalmente em solos intemperizados dos trópicos. Quando a disponibilidade desse nutriente no solo é baixa, ocorre redução do metabolismo, da massa e da superfície de vários órgãos das plantas, afetando sua produtividade. Isso se deve ao fato de que o fósforo está envolvido na produção e transporte de energia, fotossíntese, transformação de carboidratos e na composição de ácidos nucleicos, carboidratos fosfatados, fosfolipídios e coenzimas). Já o nitrogênio é constituinte de proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, fitocromos, ATP (Adenosina Tri-fosfato), clorofila e inúmeras enzimas (JAKELAITIS et al 2005), influenciando o crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente (MUNDSTOCK 2000).

O conhecimento das relações de parentesco e da diversidade genética entre os genótipos a serem melhorados contribui para a organização do germoplasma disponível e para a proteção de cultivares (Melchinger et al 1991; Bernardo 2002). Em relação a organização do germoplasma, os genótipos podem ser agrupados de acordo com a similaridade genética estimada e distribuídos em grupos heteróticos. Para a proteção de cultivares, informações sobre a distância genética entre acessos são importantes para a identificação de derivação essencial e para a proteção legal do germoplasma (Smith et al 1995). Portanto, informações a respeito da diversidade genética entre materiais elite a serem utilizados como genitores é de fundamental importância para o melhoramento (Hallauer e Miranda 1988).

¹ Doutorando em Genética e Melhoramento –UFV. E-mail: gcsant@yahoo.com.br

² Doutorando em Genética e Melhoramento –UFV. E-mail: edercml@yahoo.com.br

³ Professor da UFV. E-mail: glaucovmiranda@ufv.br

⁴ Pesquisador da EMBRAPA Pecuária Sul. E-mail: julianolf@yahoo.com.br

⁵ Professor da UFV. E-mail: borem@ufv.br

⁶ Professor da ESALQ/USP. E-mail: rfritscheneto@gmail.com

Diversos tipos de marcadores moleculares vêm sendo amplamente utilizado em estudos de diversidade e estrutura genética de populações de plantas. Os marcadores microssatélites têm sido um dos mais utilizados para essas finalidades, por apresentar características desejáveis tais como codominância, multialelismo, e elevado grau de polimorfismo (Santana et al 2012). O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética entre 14 acessos de milho, sendo 7 tolerantes a baixos níveis de nitrogênio e 7 tolerantes a baixos níveis de fósforo.

Materiais e Métodos

Nesse experimento foram utilizadas duas fontes de germoplasma do milho: a primeira composta por sete linhagens homogêneas e eficientes para o uso do fósforo e contrastantes para o uso do nitrogênio (Grupo 1), e a segunda composta por linhagens eficientes e homogêneas para o uso do nitrogênio e contrastantes para o uso do fósforo (Grupo 2). As linhagens e os híbridos que as deram origem estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens utilizadas, tolerância, híbridos que as deram origem e empresas produtoras.

Linhagens	Tolerância	Híbrido	Empresa
1	Baixo P	AGN 34M11	Agromen
2	Baixo P	P3041	Pionner
3	Baixo P	DKB350	Dekalb
4	Baixo P	P3041	Pionner
5	Baixo P	DKB435	Monsanto
6	Baixo P	Syngenta Forte	Syngenta
7	Baixo P	XB8028	Semeali
8	Baixo N	AG 8080	Agrocerec
9	Baixo N	P3041	Pionner
10	Baixo N	P30A00	Pionner
11	Baixo N	Syngenta Garra	Syngenta
12	Baixo N	Balu 551	Balu
13	Baixo N	Balu 184	Balu
14	Baixo N	P30F88	Pionner

Amostras de tecidos foliares jovens foram coletadas em cada linhagem e utilizadas para a extração de DNA. O DNA foi extraído de acordo com o método descrito por Doyle e Doyle (1990). Os 80 marcadores SSR utilizados foram selecionados com base nas unidades de repetição e locais no “Bin” para fornecer uma cobertura ampla e uniforme do genoma do milho. As sequências dos marcadores foram obtidas no Banco de Dados de Genética e Genômica do Milho – Maize GDB (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>). A amplificação por PCR foram realizadas num volume de 20 µL e o produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.

A partir dos perfis alélicos gerados com os 80 marcadores microssatélites para as 14 linhagens, foi construída uma matriz, na qual cada alelo de cada loco foi designado numericamente de 1 até o número máximo de alelos no locus. Utilizando o aplicativo computacional “Genealex 6” (Peakall e Smouse, 2006) foi estimada a Probabilidade de Identidade (para cada *locus* e acumulada). Por meio do aplicativo “Convert” foi estimada a frequência alélica para todos os *loci* individualmente. Este software foi também utilizado para converter a matriz dos dados para o formato de outros aplicativos. O PopGene32 foi utilizado para calcular o número de alelos por loco; a heterozigosidade esperada e a heterozigosidade observada. O cálculo dos valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC), a matriz de dissimilaridade genética baseada na distância “C.S. Chord” (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) e uma árvore filogenética obtida pelo método de agrupamento do vizinho mais próximo foram feitos utilizando o programa “Powermarker Version 3.25”.

Resultados e Discussão

Os 80 marcadores microssatélites utilizados nesse trabalho permitiram a diferenciação dos 14 acessos de milho analisados. Considerando os 80 locos nas 14 linhagens, foi observado um total de 299 alelos, com o número de alelos por loco variando de 1 a 8, com uma média de 3,6875. Todos os acessos se mostraram homocigotos em relação a todos os locos analisados, o que era esperado, uma vez que se trata de linhagens endogâmicas. A matriz de dissimilaridade genética baseada no índice C.S.Chord evidenciou a existência de um razoável **nível de variabilidade genética entre as** linhagens. A dissimilaridade genética variou de 0,3551 (entre 7 e 8) a 0,6885 (entre 1 e 7) com media igual a 0,5424.

O dendrograma gerado pelo método do vizinho mais próximo (FIGURA 1) evidenciou a formação de 3 grupos. O primeiro grupo é constituído por duas linhagens tolerantes a baixos níveis de Nitrogênio (11 e 12). O segundo grupo é formado por 4 linhagens tolerantes a baixos níveis de P (3, 5, 6 e 7) e duas a baixos níveis de N (8 e 13). O terceiro grupo mostrou-se dividido em dois subgrupos, um formado por 3 linhagens tolerantes a baixos níveis de P (1, 2 e 4) e outro formado por 3 linhagens tolerantes a baixos níveis de N (9, 10 e 14).

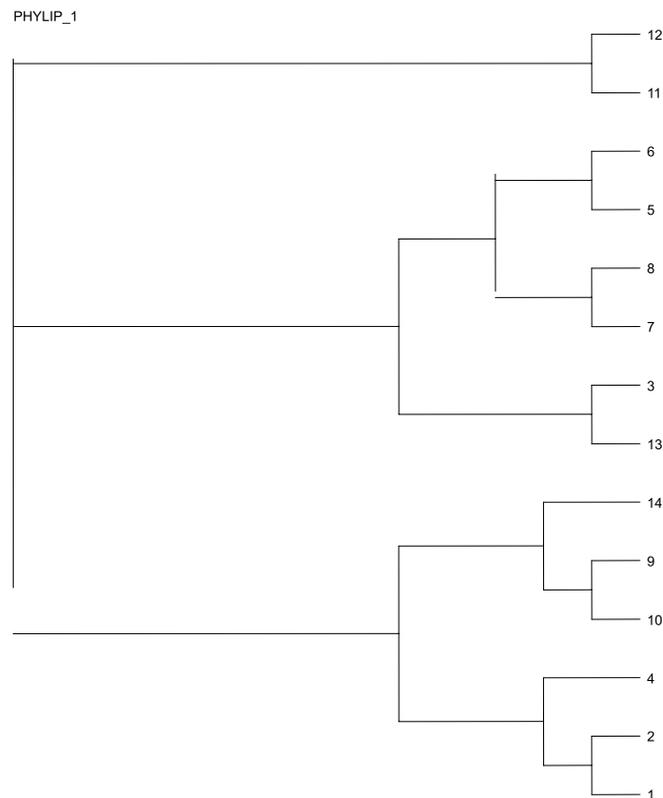


Figura 1 - Dendrograma gerado pelo método do vizinho mais próximo. As linhagens 1 a 7 são tolerantes a baixos níveis de P e as linhagens 8 a 14, a baixos níveis de N.

A capacidade específica de combinação de linhagens endogâmicas de milho, em trabalho realizado por Betran *et al.* (2003), avaliada em estresses de nitrogênio, foi negativa para híbridos, envolvendo linhagens endogâmicas originadas do mesmo germoplasma, e positiva e elevada para linhagens oriundas de fontes diferentes, demonstrando a importância da adoção de critérios que permitam a discriminação dos genitores, formando grupos divergentes para a extração de linhagens. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser úteis para o planejamento de cruzamentos entre genitores com níveis desejados de divergência genética, no sentido de contribuir para o melhoramento simultâneo para tolerância a baixos níveis de N e a baixos níveis de P.

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão das bolsa de estudo de doutorado e pelo financiamento da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- Betran FJ et al (2003) Genetic analysis of inbred and hybrid grain yield under stress and nonstress environments in tropical maize. **Crop Science**, 43:807–817.
- Bernardo R (2002) Breeding for quantitative traits in plants. Stemma Press, Woodbury, p 41, p 249
- Bredemeier C and Mundstock C. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 02, p. 365-372, 2000.
- Doyle JJ and Doyle JL.(1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12: 1315.
- Evanno G et al (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. 14: 2611-2620.
- Hallauer AR and Miranda JBF (1988) **Quantitative genetics in maize breeding**, 2nd edn. Iowa State University Press, Ames
- Jakelaitis A et al (2005) Efeitos do nitrogênio sobre o milho cultivado em consórcio com *Brachiaria brizantha*. **Acta Scientiarum Agronomy**, 27: 39-46.
- Melchinger AE et al (1991) Diversity and relationships among U.S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. **Crop Science** 31:669–678
- Sant’ana GC et al (2012) Comparison of a retrotransposon-based marker with microsatellite markers for discriminating accessions of *Vitis vinifera*. **Genetics and Molecular Research** 11: 1507-1525
- Smith JSC et al (1995) Identification of maize varieties. In: Wrigley CW (ed) Identification of food grain varieties. **America Associated of Cereal Chemists**, St Paul, pp 253–264
- Souza, L V et al. (2008) Genetic control of grain yield and nitrogen use efficiency in tropical maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 43:1517-1523.