

170

Circular  
TécnicaSete Lagoas, MG  
Dezembro, 2011

## Autores

**Christiano Costa Simões**

Estudante de Doutorado em  
Genética – UFMG  
christianosimoes78@hotmail.  
com

**Ramon Vinicius de Almeida**

Estudante de Doutorado em  
Genética e Melhoramento  
– UFV

**Jurandir V. Magalhães**

Eng.-Agr., Ph. D. em Biologia  
Molecular, Pesquisador da  
Embrapa Milho e Sorgo, Sete  
Lagoas, MG.  
jurandir@cnpms.embrapa.br

**Claudia Teixeira Guimarães**

Eng.-Agr., Doutora em  
Genética e Melhoramento,  
Pesquisadora da Embrapa  
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,  
MG.  
claudia@cnpms.embrapa.br

# Alteração nas Frequências Alélicas em Ciclos de Seleção Recorrente como Estratégia para Identificação de QTLs para Tolerância ao Al em Milho

## Introdução

O milho é uma cultura mundialmente disseminada, sendo na alimentação humana e animal sua principal utilização. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial desse cereal, com produção estimada em 57 milhões de toneladas para safra e safrinha de 2010/2011 (CONAB, 2011). Esses números indicam crescimento na produção brasileira, porém, a lavoura do milho ainda passa por limitações devido a doenças e estresses abióticos, como encontrados em solos ácidos.

Os solos ácidos estão presentes em aproximadamente 50% das terras cultiváveis do mundo, incluindo a região do Cerrado brasileiro, consistindo em um importante entrave à produção mundial de alimentos (FAGERIA et al., 2007). Nesses solos, o alumínio (Al) encontra-se na forma solúvel  $Al^{+3}$ , que possui ação citotóxica, inibindo o crescimento das raízes (KOCHIAN, 1995), reduzindo o volume de solo explorado para absorção de nutrientes e água, culminando em uma menor produção.

Para superar as limitações causadas pelos solos ácidos, uma alternativa é a utilização de cultivares tolerantes ao Al. A tolerância ao Al em milho é uma característica de herança quantitativa, sendo controlada por vários genes localizados em regiões do genoma que são identificadas como QTL (*Quantitative Trait Loci*). Portanto, a identificação e a validação desses QTLs são importantes estratégias para o aumento da adaptabilidade de cultivares, uma vez que eles podem ser introgrididos e piramidados via seleção assistida em linhagens-elites.

Além do mapeamento de QTLs e análises associativas, uma estratégia que pode ser utilizada para a detecção de regiões genômicas associadas com uma característica fenotípica é a alteração nas frequências alélicas ao longo de ciclos de seleção recorrente.

## Alteração nas frequências alélicas

A variação genética entre e dentro de populações pode ser medida utilizando as alterações na frequência alélica dentro de um loco (WEIR, 1996), sendo um importante parâmetro para avaliar a variabilidade genética em populações. Desvios nas frequências alélicas podem ser gerados pela deriva genética, migração, seleção ou mutação (HILL; ROBERTSON, 1968; LIU, 1998). Assim, esses desvios podem ser utilizados para identificar regiões genômicas de interesse, desde que sejam aplicados testes estatísticos adequados em populações apropriadas para tal finalidade.

Desvios de frequências alélicas em diferentes populações de melhoramento foram utilizados para detectar regiões genômicas associadas com caracteres de produção em diversas espécies como o milho (STUBER et al., 1980) e aveia (DE KOEYER et al., 2001). Como durante o processo de seleção, a população é enriquecida pelos alelos favoráveis que estão sob seleção, a frequência desses alelos é alterada em comparação com a frequência esperada em locos que não estão sob seleção.

Assim, no presente trabalho reportaremos um estudo de caso, utilizando três ciclos de seleção em um sintético composto por quatro linhagens de milho tolerantes ao Al e selecionadas em solução nutritiva visando a validação de QTLs de tolerância ao Al previamente identificados em uma população de linhagens recombinantes.

## Ciclos de Seleção

Foi utilizado um sintético, denominado Sintético-Alumínio, composto pelo intercruzamento de quatro linhagens de milho para formar o ciclo inicial ou C0: Cateto237/67, L1154, SLP181/71 e L3, que apresentaram níveis médios a elevados de tolerância ao Al (ALVES et al., 2004). O sintético foi submetido a três ciclos de seleção recorrente em solução nutritiva de Magnavaca et al. (1987). A seleção no ciclo C0 foi realizada com a atividade de {39}  $\mu\text{M}$  de Al, que é a concentração normalmente utilizada para a avaliação da tolerância ao Al em milho. No entanto, a seleção das plantas nos demais ciclos (C1, C2 e C3) foi realizada utilizando {60}  $\mu\text{M}$  de Al. As variedades BR106 e CMS036 foram utilizadas como testemunhas sensível e tolerante ao Al, respectivamente.

No ciclo C0, 294 plântulas foram avaliadas em solução nutritiva e as 30 plântulas mais tolerantes transplantadas em canteiro, onde todos os indivíduos foram recombinados por meio de *bulk* de pólen. Assim foi obtido o ciclo C1. Do ciclo C1, as 30 plantas mais tolerantes foram selecionadas e recombinadas da mesma maneira, gerando o ciclo C2. A partir da seleção e recombinação de C2 foi obtido o ciclo C3.

A característica fenotípica utilizada foi o Crescimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS), calculado pela divisão entre o comprimento líquido da raiz após cinco dias de tratamento com Al e o comprimento líquido da raiz pelo mesmo período em solução nutritiva sem Al.

$$\text{CRRS} = \frac{(\text{CFinal} - \text{CInicial}) \text{ com Al}^{3+}}{(\text{CFinal} - \text{CInicial}) \text{ sem Al}^{3+}}$$

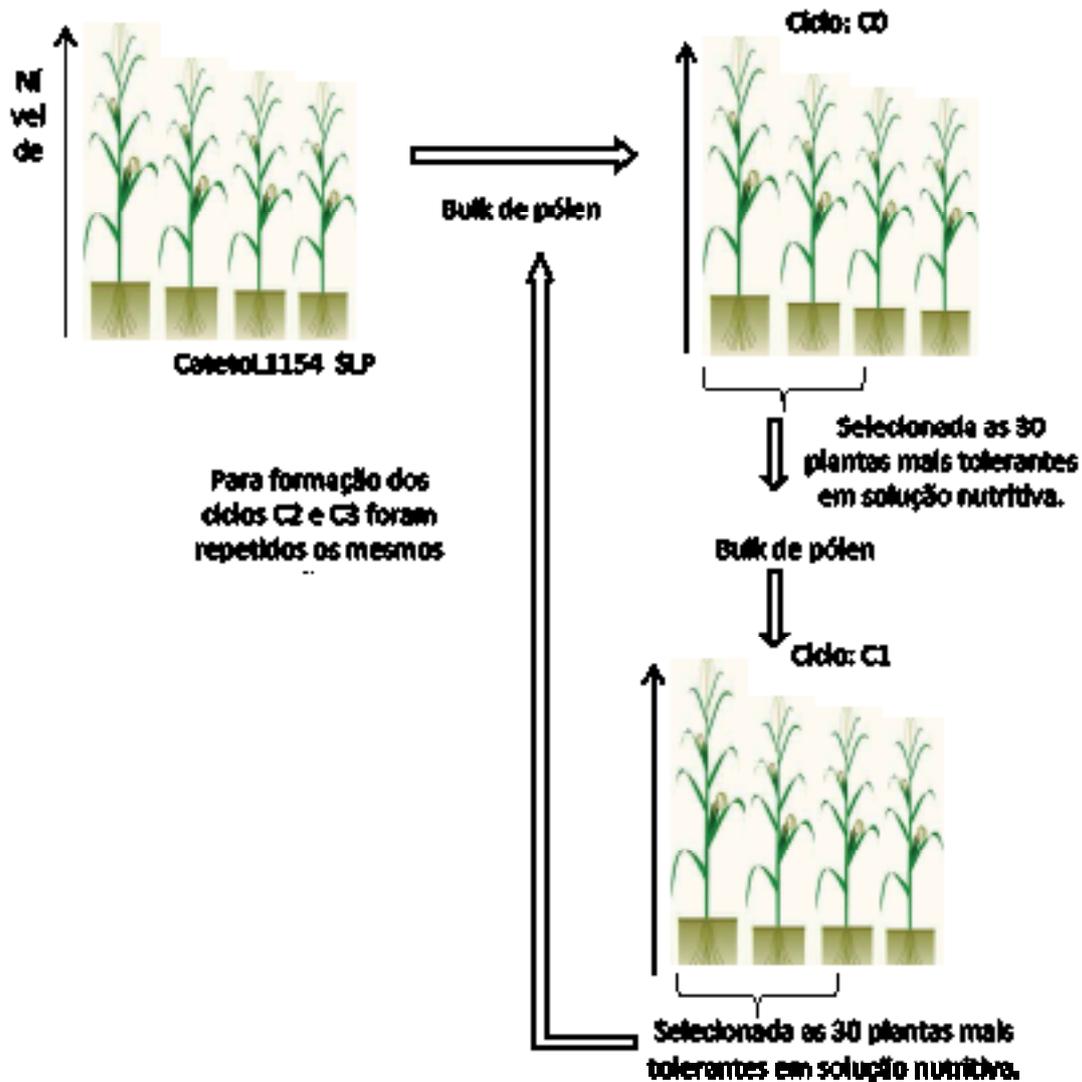
Após o sintético ter sido produzido pelo intercruzamento das linhagens, foram gerados três ciclos por meio de *bulk* de pólen com as trinta plantas mais tolerantes, selecionadas em solução nutritiva conforme o esquema apresentado na Figura 1.

## Marcadores Moleculares

Com o objetivo de quantificar os desvios na frequência alélica entre os ciclos de seleção, foram selecionados 12 marcadores microssatélites ao longo dos cromossomos 5 e 6 de milho, onde previamente foram identificados dois QTLs de efeito maior para a tolerância ao Al, derivados da linhagem Cateto 237/67 (MARON et al., 2010). Adicionalmente, nesses dois QTLs foram identificados genes candidatos homólogos ao gene *Alt<sub>SB</sub>*, que confere tolerância ao Al em sorgo (MAGALHÃES et al., 2007). A Tabela 1 mostra a posição, a probabilidade, o efeito e a proporção da variância fenotípica explicada por cada um dos QTLs de tolerância ao Al.

**Tabela 1.** QTLs de tolerância ao Al em milho incluindo os marcadores associados aos genes candidatos, sua posição em cM, o LR (Likelihood Ratio), o efeito e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL (R<sup>2</sup>).

QTL	Bin	Marcadores	Posição	LR	Efeito	R <sup>2</sup> (%)
QTL5.1	5.02	ZmMATE2	27.1	30.13	0.0624	16.0
QTL6	6.00	ZmMATE1	10.3	24.51	0.0592	16.2



**Figura 1.** Ciclos de seleção recorrente para a tolerância ao Al a partir do intercruzamento entre as linhagens Cateto 237/67, SLP181/71, L1154 e L3. As siglas C0, C1, C2 e C3 correspondem aos ciclos 0, 1, 2 e 3, respectivamente.

### Teste de Waples

Como os desvios na frequência alélica podem ser causados por deriva genética, a homogeneidade das frequências alélicas entre os ciclos de seleção foi avaliada pelo teste de contingência de qui-quadrado (GOMES, 1981) da seguinte maneira:

$$\chi^2 = \sum \frac{(F_o - F_e)^2}{F_e}$$

onde, Fo: Frequência observada e Fe: Frequência esperada

O teste de Waples (1989) foi aplicado em cada loco para verificar se as mudanças nas frequências alélicas entre os ciclos ciclo são exclusivamente atribuídas à deriva genética. Assim, ao rejeitar a hipótese Ho, pode-se inferir que a alteração na frequência alélica naquele

loco não foi ao acaso. O teste de Waples (1989) é calculado da seguinte forma:

$$Pr \left[ \chi^2 \geq \frac{Q_{(k-1)}}{C} \right]$$

sendo  $Q_{(k-1)}$  o valor crítico de para  $K - 1$  graus de liberdade,  $K$  o número de alelos em cada loco, e  $C$  a variância de cada alelo calculada conforme metodologia de Waples (1989).  $C$  é calculado segundo a fórmula:

$$C = \frac{V(x-y)}{BV}$$

onde  $V(x-y)$  é a variância das frequências de um alelo entre os ciclos  $S_0$  e  $S_t$ . Considerando  $x$  a frequência do alelo em  $S_0$  e  $y$  sua frequência em  $S_t$ ;  $BV$  é a variância das frequências de um alelo, considerando que há distribuição independente e binomial desse alelo entre os ciclos de seleção.

$$V(x-y) = P(1-P) \left[ \frac{1}{2S_0} + 1 - \left( 1 - \frac{1}{2S_t} \right) \left( 1 - \frac{1}{2N_e} \right)^t \right] \text{ onde:}$$

$P$ : probabilidade de se escolher um determinado alelo nos dois eventos amostrais;

$N_e$  = Número populacional efetivo;

$t$ : número de gerações;

$S$  = Amostragem em determinado ciclo;

$BV = V(x-y)$ . Considerando  $V(x-y) = V(x) + V(y)$

$$\text{Como: } V(x) = \frac{P(1-P)}{2S_1} \quad \text{e} \quad V(y) = \frac{P(1-P)}{2S_2}$$

$$\text{É possível chegar em: } BV = P(1-P) \left( \frac{1}{2S_0} + \frac{1}{2S_t} \right)$$

Finalmente, se o chi-quadrado calculado for maior que o valor encontrado pela metodologia de Waples ( $Q_{(K-1)}/C$ ), rejeita-se  $H_0$  e pode-se considerar que o aumento na frequência alélica é significativo e ocorreu devido à seleção imposta.

## Ganhos em tolerância ao Al ao longo dos ciclos de seleção

Dentre as linhagens que foram inter cruzadas para gerar o ciclo C0, a linhagem Cateto237/67 é a mais tolerante ao alumínio, com o crescimento relativo da raiz seminal (CRRS) de 0.91 com  $\{60\} \mu\text{M}$  de atividade de Al. A média da tolerância ao Al no ciclo C0 foi de 0.3376, um pouco inferior ao esperado considerando a média das quatro linhagens parentais. No entanto, do ciclo C0 para o ciclo C1, houve um ganho significativo da tolerância ao Al, atingindo um patamar no ciclo C2, significativamente similar à tolerância da linhagem Cateto237/67 (Tabela 2). O nível de tolerância dos ciclos C1, C2 e C3 superou o da variedade CMS036, considerada como tolerante ao Al.

**Tabela 2.** Médias do índice CRRS dos ciclos de seleção, nas linhagens parentais e nas testemunhas.

Genótipos	Médias*	
C0	0.3376	fg
C1	0.7875	abc
C2	0.8923	a
C3	0.8611	ab
Cateto237/67	0.9158	a
L1154	0.6696	cd
L3	0.3557	fg
SLP181/71	0.3329	fg
CMS036	0.4584	ef
BR106	0.2469	g

\* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A porcentagem de ganho total ao longo dos três ciclos de seleção foi de 155%, considerando o cálculo  $(C3 - C0)/C0 \times 100$ . Assim, podemos considerar que a seleção em solução nutritiva foi eficiente em aumentar a tolerância ao Al, atingindo o máximo da tolerância com dois ciclos de seleção recorrente. Apesar de, em termos

médios, não ter sido observada uma superação do patamar de tolerância apresentado pela linhagem Cateto237/67, podemos considerar que ainda existe variabilidade genética dentro dos ciclos C2 e C3, onde haveria possibilidade de selecionar indivíduos com altos níveis de tolerância em função da piramidação de alelos superiores derivados de locos distintos.

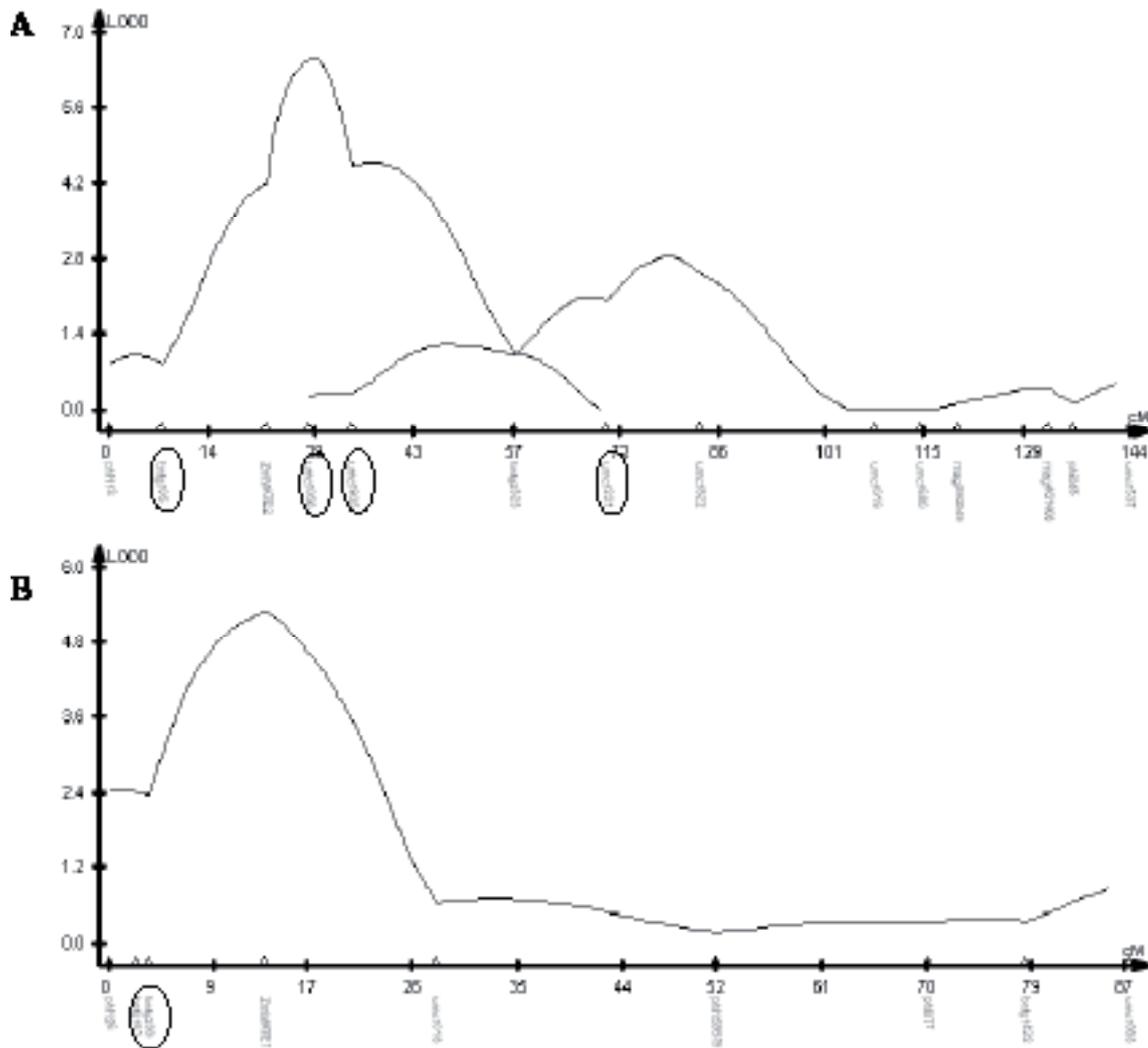
### Validação de QTLs de tolerância ao AI pelos desvios nas frequências alélicas

As análises das frequências alélicas dos 12 marcadores microssatélites, obtidos pelo teste padrão de contingência de qui-quadrado, determinaram que as alterações nas frequências alélicas não foram significativas. Tal resultado sugere que todos os locos não tiveram suas frequências alteradas por deriva genética ou pela amostragem. No entanto, os resultados obtidos pelo teste de Waples (1989), determinaram que os locos bnlg105, umc1056, umc1956 e umc1221 no cromossomo 5, bnlg238 e phi126 no cromossomo 6, sofreram alterações significativas nas frequências alélicas entre os ciclos C0 e C2. Assim, pode-se considerar que os desvios na frequência alélica desses locos ocorreram devido à seleção em solução nutritiva.

Nota-se que os marcadores que sofreram desvios nas frequências alélicas segundo Waples (1989), estão localizados próximos às regiões de QTLs de tolerância ao AI previamente identificados por Maron et al. (2010) e apresentados na Figura 2. Os marcadores bnlg105, umc1056 e umc1935 estão localizados no segundo maior QTL que explica 16% da variância do fenótipo, enquanto o marcador umc1221 está próximo a um QTL de efeito menor localizado também no cromossomo 5. Já os marcadores bnlg238 e phi126 estão situados no principal QTL de tolerância ao AI que explica 16.2% da variação fenotípica, no cromossomo 6.

**Tabela 3.** Marcadores que sofreram alteração significativa nas frequências alélicas segundo Waples (1989) entre os ciclos de seleção C0 e C2 a 5% de significância.

Marcador	Cromossomo	Posição (Mpb)	Posição QTL (Mpb)	$\chi^2$ calc.	$\chi^2$ Tab.	$Q_{(K-1)}/C$
bnlg105	5	13.853	20.601	1.237	7.8147	0.16181
umc1056	5	31.350	20.601	0.547	5.991	0.51234
umc1935	5	50.744	20.601	0.58	7.8147	0.35368
umc1221	5	168.079	173.568	1.151	7.8147	0.76553
bnlg238	6	3.390	5.866	3.318	7.8147	0.25069
phi126	6	3.390	5.866	1.777	7.8147	0.83778



**Figura 2.** Principais QTLs de tolerância ao AI em milho localizados nos cromossomos 5 e 6. Os marcadores que sofreram desvio significativo na frequência alélica segundo Waples (1989), estão circundados em preto. Os marcadores ZmMATE1 e ZmMATE2 não foram avaliados no ciclo de seleção.

## Conclusões e Implicações

A seleção recorrente em solução nutritiva foi eficiente em aumentar a tolerância ao AI, a partir do primeiro ciclo, atingindo o máximo da tolerância no ciclo C2. A busca por indivíduos que possuam combinações favoráveis de alelos de locos distintos pode ser realizada por meio de uma seleção dentro dos ciclos C2 e C3, onde devem existir indivíduos com patamares de tolerância superiores à linhagem Cateto237/67.

A co-localização entre os locos que tiveram suas frequências alélicas alteradas pela seleção com QTLs de tolerância ao AI confirma que nessas regiões genômicas existem fatores genéticos afetando essa característica. Assim, uso desses marcadores flanqueando os QTLs de efeito maior pode ser uma estratégia interessante para a introgressão de alelos superiores de tolerância ao AI em linhagens elite.

## Referências

ALVES, V. M.; PITTA, G. V. E.; PARENTONI, S. N.; SCAFFERT, R. E.; COELHO, A. M.; MAGALHÃES, J. V. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 311-318, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 04 out. 2011.

DE KOEYER, D. L.; PHILIPS, R. L.; STUTHMAN, D. D. Allelic shifts and quantitative trait loci in a recurrent selection population of oat. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1228-1234, 2001.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C.; ZOBEL, R. W. Yield nutrient uptake and soil chemical properties as influenced by liming and boron application in common bean in no-tillage system. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 38, p. 1-17, 2007.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1981. 430 p.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants.

**Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

HILL, W. G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, Nova York, v. 33, p. 226-231, 1968.

LIU, B. H. **Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 611. 1998.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.; SCAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N. and KOCHIAN L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, p. 1156-1161, 2007.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.; CLARK, R. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H. L. B. (Ed.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Kluwer, 1987. p. 255-265.

MARON, L. G.; PINEROS, M. A.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V.; PLEIMAN, J. K.; MAO, C. Z.; SHAFF, J.; BELICUAS, S. N. J.; KOCHIAN, L. V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, p. 728-740, 2010.

STUBER, C. W.; MOLL, R. H.; GOODMAN, M. M.; SCHAFFER, H. E.; WEIR, B. S. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.) **Genetics**, Maryland, v. 95, p. 225-236, 1980.

WAPLES, R. S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. **Genetics**, Maryland, v. 121, p. 379-391, 1989.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

### Circular Técnica, 170

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** sac@cnpms.embrapa.br  
**1ª edição**  
1ª impressão (2011): on line

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



### Comitê de publicações

**Presidente:** Antônio Carlos de Oliveira.  
**Secretário-Executivo:** Elena Charlotte Landau.  
**Membros:** Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

### Expediente

**Revisão de texto:** Antonio Claudio da Silva Barros.  
**Normalização bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro.  
**Tratamento das ilustrações:** Tânia Mara A. Barbosa.  
**Editoração eletrônica:** Tânia Mara A. Barbosa.