

Mapeamento de QTLs Associados Com a Tolerância de Sementes de Milho à Alta Temperatura de Secagem

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

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; clarissaaf04@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Zea mays*, temperatura de secagem, QTL, sementes, marcador molecular.

A colheita de sementes de milho em espiga favorece a antecipação da mesma e consequentemente a viabilização das estruturas de beneficiamento e de secagem. Além disso, esse método permite que as sementes sejam colhidas mais próxima ao ponto de maturidade fisiológica e com máxima qualidade. Porém, sementes colhidas em espigas, com altos teores de água, podem sofrer danos no processo de secagem. Segundo José et al. (2004b), a susceptibilidade da semente aos danos de secagem depende dentre outros fatores do genótipo. Porém, o processo de tolerância a altas temperaturas de secagem é complexo e pouco compreendido, requerendo estudos mais detalhados para possibilitar a aplicação em programas de melhoramento.

Grande parte dos trabalhos de melhoramento genético que tem utilizado marcadores moleculares é priorizada para caracteres de herança simples, uma vez que as variações fenotípicas são de fácil mensuração e análise (Lanza, 2000). Entretanto, a maioria das características de importância econômica em milho é classificada como poligênicas ou quantitativas (Stuber, 1995).

Ao contrário da pré-suposição de que características quantitativas são influenciadas por muitos genes de pequeno efeito, Lande (1981) sugeriu que poucos genes poderiam explicar uma proporção relativamente grande da variação genética para características quantitativas. Tais genes de efeito maior, são conhecidos como QTL (*Quantitative Trait Loci* - caracteres de herança quantitativa) e, algumas vezes não podem ser localizados individualmente. Porém, é possível a localização da região do genoma em que estes locos podem estar presentes, bem como estimar o quanto tais locos contribuem para a variação total do fenótipo.

Um grande número de genes com um efeito potencial tanto na termotolerância quanto na tolerância de plantas e sementes a estresse hídrico têm sido descritos, sendo que um maior entendimento das respostas moleculares a esses estresses tem sido obtido por meio da avaliação de tais genes. Além disso, as regiões genômicas onde se encontram os locos controladores dessas características vêm sendo alvo de diversos estudos, visando o conhecimento da magnitude dos efeitos e as interações desses genes ou QTLs.

Procurou-se nessa pesquisa identificar QTLs, bem como a ação genética e quantificação dos efeitos dessas regiões na variação fenotípica da tolerância de sementes a alta temperatura de secagem.

A presente 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 no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

As linhagens de milho LE12 e LE5, com sementes intolerantes e tolerantes a secagem a alta temperatura, respectivamente, foram cruzadas para a obtenção de uma população F2:3. 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 secadas a 45 °C, usando um secador de acordo com o modelo descrito por Rosa (2000).

Após a secagem as sementes foram avaliadas quanto à tolerância a dessecação pelo teste de envelhecimento acelerado de acordo com o trabalho de José et al. (2004a). Os ensaios para a avaliação de microssatélites e as análises de ligação dos marcadores foram descritos por Salgado et al. (2005). O mesmo mapa de ligação foi usado no presente trabalho. Para o mapeamento do QTL, os dados moleculares e os resultados de vigor observados no teste de envelhecimento acelerado foram associados por meio do modelo de regressão simples, utilizando o programa QTL Cartographer para Windows versão 1,21 (Basten et al., 2000), sendo que as associações foram consideradas significativas a um nível de probabilidade $P < 0,01$ e o coeficiente de determinação (r^2) foi interpretado como a estimativa da proporção da variância fenotípica explicada por cada marcador.

O mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1994) foi realizado utilizando as informações do mapa de ligação e o programa QTL Cartographer para Windows versão 1,21 (Basten et al., 2000). O intervalo de precisão foi de 1 cM, com uma distância de 10 cM para controlar a interferência de múltiplos QTLs por meio de modelos de regressão *backward* e *forward*. A localização do QTL mais provável foi estimada pela função verossimilhança, sendo plotada uma curva em valores de LR para cada cM do genoma mapeado. O limite de significância foi determinado utilizando-se 1000 permutações ao acaso dos dados fenotípicos ($\alpha = 0,05$), segundo Doerge & Churchill (1996).

A ação gênica de cada QTL detectado foi determinada por meio das estimativas do grau de dominância ($d/[a]$) e classificadas segundo o critério proposto por Stuber et al. (1987): aditivo (A) = 0 a 0,20; dominância parcial (DP) = 0,21 a 0,80; dominância (D) = 0,81 a 1,20 e sobredominância (OD) > 1,20.

Apenas os marcadores que foram mapeados nos grupos de ligação gerados pelo programa Gqmol foram utilizados nesse processo de mapeamento. Os marcadores que não se ligaram a nenhum grupo foram excluídos dessa análise, o que levou à utilização de somente 39 marcadores na análise de intervalo composto.

Os marcadores não ligados puderam ser avaliados pela análise de regressão linear simples. Desses marcadores, somente para o umc1029, localizado no bin 7.04 houve uma associação significativa entre o marcador e QTL. Os demais marcadores significativamente associados à QTLs pela análise de regressão linear simples se encontram agrupados nos grupos de ligação que foram utilizados na análise de intervalo composto.

Por meio do mapeamento por intervalo composto, foram mapeados três QTLs associados com a tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem, sendo estimadas suas contribuições na variância fenotípica, seus efeitos e ação gênica.

Pela análise de intervalo composto, os QTLs explicaram conjuntamente 39% da variação fenotípica quanto à tolerância à alta temperatura de secagem. Considerando o grau de dominância ($d/[a]$) dos três QTLs detectados, observa-se que foram detectados efeitos aditivos, de dominância e de sobredominância. Tais resultados estão de acordo com José et al. (2004b), que observaram efeitos da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, bem como efeitos recíprocos significativos para a tolerância à alta temperatura de secagem, indicando a presença de genes de efeitos aditivos e não aditivos no controle genético para essa característica, tendo sido os efeitos genéticos aditivos mais importantes na determinação do caráter.

Na posição 6.05 do cromossomo 6, foi identificado um QTL ligado ao marcador nc013, explicando 10,61% da variância fenotípica. Esse QTL apresenta efeito dominante e o sinal negativo do efeito aditivo indica que o alelo favorável foi doado pelo genitor intolerante à alta temperatura de secagem (Tabela 1). No mesmo cromossomo, mas no bin 6.08 ligado ao marcador umc2059, foi identificado um QTL explicando 10,27% da variância fenotípica da característica, com um efeito de dominância para a expressão do fenótipo. O terceiro QTL foi mapeado na posição 8.05, próximo ao marcador phi014. Esse QTL explicou 14,10% da variação fenotípica, possuindo um efeito de sobredominância.

TABELA 1 - Posição, porcentagem de variância fenotípica (Vf), efeitos e ação gênica dos QTLs associados à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem, por meio do mapeamento de intervalo composto e regressão simples. UFLA, Lavras, MG, 2005.

Bin	Mapeamento por intervalo composto							Marca simples			Ação gênica
	LR			Vf (R ²)	Efeitos gênicos			F	Prob.	Vf (R ²)	
	Marca	Significância	Máxima		a	d	(d/a)				
6.05	Nc0013	11.35	11.79	10.61	-17.62	15.77	0.89	7.75	0.006*	7.63	Dominante
6.08	umc2059	8.72	10.27	10.05	17.69	4.11	0.22	10.26	0.002*	9.97	Aditivo
8.05	phi014	8.64	9.70	14.1	12.21	23.64	1.9	6.27	0.02*	5.36	Sobredominante

** significativo a 1% de probabilidade;

* significativo a 5% de probabilidade;

LR: razão da verossimilhança.

Significância: limite determinado por 1.000 permutações ao acaso dos dados fenotípico para cada cromossomo.

r²: proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL

a: efeito aditivo; d: efeito de dominância; d/[a]: grau de dominância

Pela análise de marcas simples, os marcadores nc013 e umc2059, localizados no cromossomo 6, explicaram 7,63% e 9,97% da variação fenotípica, respectivamente. Já o marcador phi014, localizado no cromossomo 8, explicou 5,36% da variação fenotípica da tolerância (Tabela 1). Pelos resultados apresentados, observa-se que os valores da variância fenotípica desses marcadores obtidos pela análise de marca simples foram mais baixos que os observados pela análise de intervalo composto, indicando que essa última análise possui um maior poder de estimativa dos efeitos dos QTLs.

Esses marcadores parecem estar efetivamente associados com a característica avaliada, uma vez que todos se encontram mapeados próximos a genes cujos produtos de expressão vêm sendo associados com a tolerância à dessecação das sementes. O QTL₃, que está localizado no bin 8.05, apresenta-se próximo a três genes, o *ncr(sod3c)* que codifica para superóxido dismutase, o *act1*, que codifica para actina e o *tub2*, cujo produto gênico é uma beta tubulina (*Maize Genetics and Genomics Database*, 2005).

Tanto os microtúbulos quanto os microfilamentos de actina compõem o citoesqueleto. São os principais componentes dos fusos mitóticos e meióticos, auxiliando o movimento dos cromossomos durante a mitose e a meiose. A organização dos microtúbulos é sensível a diferentes fatores ambientais, incluindo elevadas temperaturas (Bajer et al., 1993). Em eixos

embrionários desidratados, essa estrutura se torna desorganizada, tanto em sementes tolerantes quanto intolerantes à dessecação. Nessas últimas, diferentemente das tolerantes, o citoesqueleto não se torna novamente organizado com o processo de embebição da semente, causando, então, danos às sementes (Berjak & Pammenter, 2003).

Além da região genômica onde está mapeado o QTL₃, outro loco da superóxido dismutase, *ncr(sod3a)*, encontra-se localizado no bin 6.05. Segundo as informações encontradas no *Maize Genetics and Genomics Database* (2005), o produto gênico desse loco encontra-se localizado na mitocôndria. Injúrias na membrana mitocondrial e nas proteínas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons podem resultar na geração de radicais livres. Os radicais livres geralmente causam danos em ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, tendo como primeiro alvo as membranas, o que constitui uma das causas da perda da integridade das mesmas em organismos sensíveis à dessecação quando estão sob condições de estresse hídrico (Hoekstra, 2002; Mundree et al., 2002). Dessa forma, mecanismos antioxidantes constituem parte da adaptação ao estresse térmico e vêm sendo fortemente correlacionados com a aquisição de termotolerância (Maestri et al., 2002).

Os marcadores *nc013* e *umc2059*, ligados aos QTLs 1 e 2 no cromossomo 6, encontram-se mapeados próximo aos locos que codificam a deidrina 1 (*dhn1*), proteína de choque térmico (*hsp101*) e a proteína LEA do grupo 3 (*mlg3*), além da superóxido dismutase. Nieto-Soletto et al. (2002) mapearam o marcador *umc132* ligado a uma proteína de choque térmico em milho. Segundo os autores, a região desse marcador, que está localizado no bin 6.07, está envolvida com a sensibilidade à seca e com a concentração de ABA tanto no xilema quanto em folhas.

LEA proteínas do grupo 3 e do grupo 2, que é conhecido como deidrina, são acumuladas quando há sinal de algum estresse, sendo associadas com a maturação e a tolerância à dessecação de sementes (Yang et al., 1997; Baker et al., 1988; Thomann et al. 1992).

A proteína choque térmico *Hsp101* foi encontrada por Kollipara et al. (2002) com diferenças na expressão entre sementes de milho tolerantes e intolerantes à alta temperatura de secagem, sendo que a mesma se encontra entre os locos dos marcadores *nc013* e *umc2059*, mapeados no presente trabalho. As proteínas *Hsp*, cuja expressão é induzida pelos mesmos tipos de estresse que induzem a expressão de LEAs proteínas, têm sua síntese coincidente com a aquisição da tolerância à dessecação (Hoekstra et al., 2001).

A identificação desses QTLs certamente oferece contribuição para o entendimento da tolerância de sementes de milho a alta temperatura de secagem, podendo levar a identificação de genes e elucidação dos mecanismos envolvidos na expressão da tolerância. Considerando que tantos os efeitos aditivos, dominantes e sobredominantes são importantes no controle da tolerância à alta temperatura de secagem, a escolha de métodos de melhoramento que explorem todas as fontes de variabilidade para essa característica em milho é de fundamental importância.

BAJER, A.S.; SMIRNOVA, E.A.; MOLE-BAJER, J. Microtubule converging centres - implications for microtubule dynamics in higher plants. **Chromosome Segregation and Aneuploidy, NATO ASI Series**, v. H72, (ed. B. K. Vig), p.225-239. Springer-Verlag, Berlin. 1993.

BAKER, J.C.; STEELE, C.; DURE, L.III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. **Plant Molecular Biology**, v.11, p.277-291, 1988.

BASTEN, C.J.; WEIR, B.S.; ZENG, Z.B. **QTL cartographer**: version 1.14. Raleigh: North Caroline State University, 2000. 139p.

BERJAK, P & PAMMENTER, N.W. Chapter 4: Orthodox and recalcitrant seeds. In: **Tropical Tree Seed Manual**. [s.l.]: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003. 874p.

DOERGE, R.W.; CHRUCHILL, G.A. Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. **Genetics**, v.142, p.285-294, 1996.

HOEKSTRA, F.A Role of respiration in desiccation tolerance. **Chapter 11: Respiration and Lipid Metabolism** Essay 11.5. **Plant Physiology online**. August, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphys.net>>.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, v.6, p.431-438, 2001.

JOSÉ, S.C.B.R.; PINHO, E.V.R.V.; PINHO, R.G.V.; RAMALHO, M.A.P.; SILVA FILHO, J.L. Controle genético da tolerância a alta temperatura de secagem de sementes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.3, n.3, p.414-428, 2004b.

JOSÉ, S.C.B.R.; VON PINHO, E.V.R.; VON PINHO, R.G.; SILVEIRA, C.M. Tolerância de sementes de linhagens de milho a alta temperatura de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.5, p.1107-1114, 2004a.

KOLLIPARA, K.P.; SAAB, I.N.; WYCH, R.D.; LAUER, M.J.; SINGLETARY, G.W. Expression profiling of reciprocal maize hybrids divergent for cold germination and desiccation tolerance. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.129, p.974-992, 2002.

LANDE, R. The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. **Genetics**, Bethesda, v.12, p.185-199, 1981.

LANZA, M.B.; GUIMARÃES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Inf. Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.204, p.97-108, 2000.

MAESTRI, E.; KLUEVA, N.; PERROTA, C.; GULLI, M.; NGUYEN, H.T.; MARMIROLI, N. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. **Plant Molecular Biology**, v.48, p.667-681, 2002.

MUNDREE, S.G.; BAKER, B.; MOWLA, S.; PETERS, S.; MARAIS, S.; WILLIGEN, C.V.; GOVENDER, K.; MAREDZA, A.; SAMSON, M.; FARRANT, J.M.; THOMSON, J.A. Physiological and molecular insights into drought tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v.1, n.2, p.28-38, December, 2002.

NIETO-SOTELO, J. et al. Maize HSP101 plays important role in both induced and basal thermotolerance and primary root growth. **The Plant Cell**, v.14, p.1621-1633, July 2002.

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) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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.

STUBER, C.W. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. **Plants**, v.11, n.12, p. 477-481, Dec. 1995.

STUBER, C.W.; EDWARDS, M.D.; WENDELL, J.F. Molecular marker facilitated investigations quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, Madison, v.27, p.639-648, 1987.

THOMANN, E.B. et al. Accumulation of group 3 late embryogenesis abundant proteins in Zea mays embryos. **Plant Physiology**, Palo Alto, v.99, p.607-614, 1992.

YANG, H. et al. *Arabidopsis thaliana* ECP63 encoding a LEA protein is located in chromosome 4. **Gene**, v.184, p.83-88, 1997.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1468, 1994.