

## Divergência genética entre cultivares de milho quanto ao teor de carotenoides nos grãos

RIOS, S.A.<sup>(1)</sup>, BORÉM, A.<sup>(1)</sup>, GUIMARÃES, P.E.O.<sup>(2)</sup>, PAES, M.C.D.<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Fitotecnia, CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: [sarariosss@yahoo.com.br](mailto:sarariosss@yahoo.com.br); [borem@ufv.br](mailto:borem@ufv.br). <sup>(2)</sup> Embrapa Milho e Sorgo, C.P. 285, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: [evaristo@cnpms.embrapa.br](mailto:evaristo@cnpms.embrapa.br); [mcdpaes@cnpms.embrapa.br](mailto:mcdpaes@cnpms.embrapa.br)

Palavras-chave: *Zea mays*, carotenoides, diversidade genética, variabilidade.

### 1. Introdução

A biofortificação de alimentos – desenvolvimento de alimentos fortificados geneticamente - é a mais atual estratégia agrícola a fim de auxiliar programas de intervenção nutricional para o combate à fome oculta no mundo. O melhoramento convencional e a transgenia tem tido como principal foco a obtenção de genótipos com alto valor nutricional, ricos em Fe, Zn e carotenoides precursores de vitamina A, além do alto valor agrônômico, para atender às necessidades das populações em situação de risco (HOTZ et al., 2007; WHITE e BROADLEY, 2009; BOUIS e WELCH 2010).

O sucesso da biofortificação de alimentos depende em primeira instância da existência de variabilidade genética suficiente para atender aos objetivos dos programas e, diversos resultados de pesquisa apontam existência de variação fenotípica para Fe, Zn e vitamina A em diversas culturas (HARJES et al., 2008; GUPTA et al., 2009; BOUIS e WELCH 2010).

Em milho, avanços no desenvolvimento de variedades *Quality Protein Maize* (QPM) trouxeram boas expectativas nutricionais para os grãos (RODRIGUES, 2000). Porém, em geral, para Fe e Zn, dificuldades de amostragem, complexidade da herança e a interação genótipo x ambiente, tornam mais trabalhosa a obtenção de genótipos biofortificados para estes micronutrientes. Já, em termos de precursores de vitamina A, apesar da existência de interação genótipo x ambiente, observa-se repetibilidade para os resultados fenotípicos.

Os carotenoides presentes nos grãos de milho se dividem em dois grandes grupos: carotenos ( $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno) e xantofilas (luteína,  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina), sendo que 90% destes compostos no grãos são constituídos por luteína e zeaxantina (GOODWIN, 1980). A atividade pró-vitáminica A é resultante do  $\beta$ -caroteno e, em menor grau, do  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina. Na verdade,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina exibem, individualmente, apenas 50% de atividade pro-vitáminica A (RODRIGUEZ-AMAYA e KIMURA, 2004).

Vários estudos têm mostrado diferença significativa entre genótipos de milho para níveis de carotenoides. Rocheford (2008) avaliando 300 linhagens de milho, encontrou variações para os teores de CT entre 0,08 e 65,95  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . No Brasil, algumas linhagens QPM apresentaram média de 37,2  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de CT (PAES et al., 2006). Já se dispõe de linhagem com 13,6  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno, resultado extremamente promissor uma vez que o alvo para carotenoides precursores de vitamina A é de 15  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (ORTIZ-MONASTERIO et al., 2007; HARJES et al., 2008).

Cardoso et al. (2009) reportaram a existência de variabilidade genética para carotenoides apresentando possíveis grupos de genótipos promissores para cruzamentos



contrastantes. Porém, considerando a ocorrência de expressão diferencial dos genes, os estudos de diversidade, sempre que possível, deveriam levar em consideração avaliações em ambientes contrastantes para recomendação de genitores potenciais à formação de população base. Diversos estudos têm relatado não só números variáveis de agrupamentos em diferentes ambientes, mas diferentes agrupamentos de genótipos de um ambiente para outro (FIGUEIREDO, MALHEIROS e BRAZ, 2004; SÁVIO et al., 2008). Logo, o objetivo deste trabalho foi estimar a divergência genética para carotenoides em cultivares de milho avaliados em dois ambientes distintos.

## 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, avaliando-se dois ambientes, no município de Sete Lagoas/MG, distintos quanto ao nível de fertilidade do solo: o primeiro ambiente onde foi feita adubação com altos níveis de nitrogênio (120 kg.ha<sup>-1</sup>: 20 kg no plantio e 100 kg em cobertura) e o segundo, com adubação utilizando-se baixos níveis de nitrogênio (20 kg.ha<sup>-1</sup> no plantio) (Tabela 2), ambos, entre os estádios V2 e V4. A descrição dos 10 cultivares, suas origens, além de outras características encontram-se na Tabela 1. 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.

As análises foram conduzidas no Laboratório de Qualidade de Grãos 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 dois ambientes de avaliação, com duas repetições.

Tabela 1: Caracterização dos cultivares de milho quanto à procedência, tipo de grão e população

<b>Cultivares</b>	<b>Procedência</b>	<b>Tipo e coloração dos grãos</b>	<b>População</b>
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

A debulha foi feita mecanicamente com posterior moagem dos grãos em micro moinho, tipo ciclone MA 020 MARCONI (Piracicaba, SP) e acondicionamento 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 da fertilidade dos solos em Sete Lagoas/MG para posterior adubação nitrogenada, caracterizando os ambientes de Alto N (120 kg.ha<sup>-1</sup>: 20 kg no plantio e 100 kg em cobertura) e Baixo N (20 kg.ha<sup>-1</sup> no plantio)

Local	Ambiente	pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Cu	Zn	Fe	Mn
		(água)	g/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>	-----cmolc/dm <sup>3</sup> --	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Sete Lagoas/MG	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

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 ( $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos) e xantofilas luteína, zeaxantina e  $\beta$ -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 $\mu$ m, 4,6x250mm, Waters, Milford, MA, USA), acoplado a detector de arranjo de diodo. O gradiente de eluição foi conduzido a 0,8mL min<sup>-1</sup> 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).

O somatório dos teores de luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno resultou nos valores de carotenoides totais (CT). O total de carotenoides precursores de vitamina A (Pro VA) foi obtido por meio do somatório entre o total de  $\beta$ -caroteno + 1/2 total de  $\alpha$ -caroteno + 1/2 do total de  $\beta$ -criptoxantina, considerando 100% de atividade pró-vitamínica A para  $\beta$ -caroteno e 50% para as outras duas variáveis (RODRIGUEZ-AMAYA & KIMURA, 2004).

Adotaram-se as distâncias generalizadas de Mahalanobis (D<sup>2</sup>) como medida de dissimilaridade e o método de Tocher para agrupamento dos cultivares. As análises estatísticas foram executadas separadamente para cada ambiente de avaliação, utilizando-se o software Genes, Cruz (1998).

### 3. Resultados e discussão

Em geral, verificaram-se teores de carotenoides nos cultivares avaliados, inferiores aqueles encontrados em linhagens elite de diversos programas de melhoramento do mundo (dados não apresentados). Porém, ainda que inferiores, estes materiais poderiam auxiliar na reversão de quadros de deficiência nutricional para aquelas populações cujo hábito cultural é o consumo de milho branco, que tem pouco ou quase nenhum teor de carotenoides nos grãos.



A Tabela 2 descreve os grupos similares de cultivares de milho avaliados sob Alto N, com o agrupamento de 3 genótipos nos grupos 1 e 2, e pares de genótipos no terceiro e quarto grupos. Em condições de Baixo N, o grupo 1 apresentou o maior número de genótipos. Estes resultados caracterizam a existência de agrupamentos distintos sob diferentes condições de fertilidade do solo, provavelmente, pela expressão diferencial dos genes. Coimbra et al. (1999) relataram a formação de agrupamentos distintos, tanto no número de grupos formados quanto no número e constituição de genótipos de feijão em cada grupo, considerando duas safras (safra e safrinha) no município de Chapecó em SC. Para Falconer (1987) um caráter medido em dois ambientes não deve ser visto como único e sim como dois caracteres e Baniwal e Jatarsa (1980) relataram que o efeito do ambiente na expressão do caráter coloca dúvidas quanto à segurança das análises da distância de Mahalanobis quando estas são realizadas com dados de um único ambiente, enfatizando a necessidade de que os estudos sejam efetuados em condições ambientais múltiplas.

Tabela 2: Grupos similares de cultivares de milho avaliados em dois ambientes distintos<sup>(1)</sup>, agrupadas com base na distância de Mahalanobis e Método Tocher

Grupos	Alto N	Baixo N
1	4, 7 e 6	7, 9, 6, 2 e 10
2	2, 10 e 1	3 e 5
3	3 e 5	1 e 4
4	8 e 9	8

<sup>(1)</sup>Alto N: altos níveis de aplicação nitrogenada (120 kg.ha<sup>-1</sup>: 20 kg no plantio e 100 kg em cobertura); Baixo N: baixos níveis de aplicação nitrogenada (20 kg.ha<sup>-1</sup> no plantio).

A contribuição relativa dos caracteres para a divergência genética dos 10 cultivares de milho nos dois ambientes está descrita na Figura 1. Pode ser observado que os caracteres não tiveram a mesma estimativa de contribuição relativa e nem a ordem de classificação para contribuição da divergência genética nos dois ambientes, caracterizando influência da interação genótipo x ambiente. Porém, luteína e zeaxantina apresentaram contribuições relativas significativas nos dois ambientes, podendo ser priorizadas no estudo de diversidade genética para carotenoides em milho.

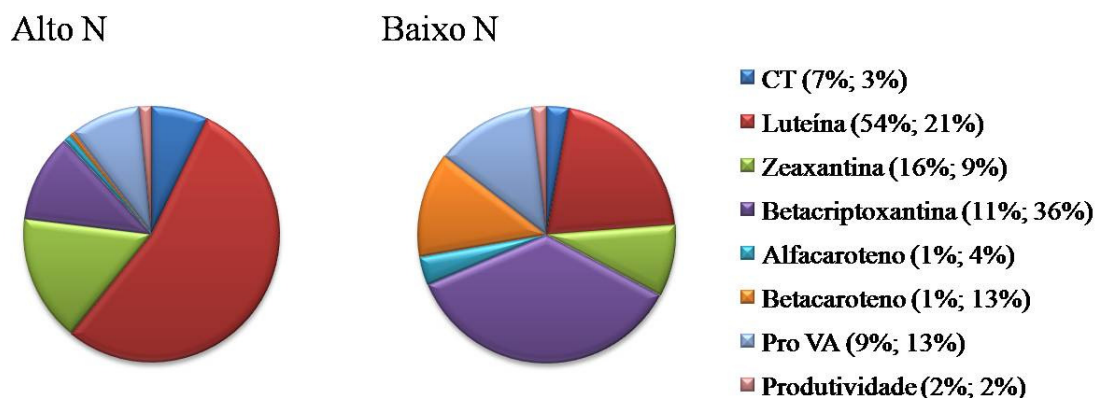


Figura 1: Contribuição relativa dos oito caracteres para a divergência genética em 10 cultivares de milho, avaliados em dois ambientes distintos (Alto N e Baixo N),



safra 2004/2005, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Os valores em parênteses representam as contribuições percentuais em Alto N e Baixo N, respectivamente.

#### **4. Conclusões**

1. O efeito do ambiente na expressão dos caracteres avaliados sugere a necessidade de que estes estudos sejam efetuados em várias condições ambientais.
2. Os caracteres que mais contribuíram para a diversidade genética entre os cultivares estudados foram luteína e zeaxantina, considerando os dois ambientes de avaliação.

#### **5. Referências**

- AACC. American Association of Cereal Chemists. Approved Methods, 10. ed. St. Paul: AACC, 2000.
- BAINIWAL, C.R.; JATARSA, D.S. Genetic divergence in pigeon pea. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, v. 40, p. 153-156, 1980.
- BOUIS, H. E.; WELCH, R.M. Biofortification - A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop Science*, v.50, p. S20-S32, 2010.
- 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*, Brasília, v.44, n.2, p.164-173, 2009.
- COIMBRA, J.L.M. Divergência genética em feijão preto. *Ciência Rural*, v.29, n.3, p. 427-431, 1999.
- CRUZ, C.D. Genes - Software for experimental statistics in genetics. *Genetic and Molecular Biology*, v. 21, p. 135-138, 1998.
- FALCONER, D.S. Introdução à genética quantitativa. Viçosa: Imprensa Universitária, 1987. 279 p.
- FIGUEIREDO, E.B. de; MALHEIROS, E.B.; BRAZ, L.T. Interação genótipo x ambiente em cultivares de alface na região de Jaboticabal. *Horticultura Brasileira*, v.22, n.1, p. 66-71, 2004.
- GOODWIN, T.W. The Biochemistry of the carotenoids. v.1: Plants (New York: Chapman and Hall), 1980.
- GUPTA, H. S.; AGRAWAL, P. K.; MAHAJAN, V.; BISHT, G. S.; KUMAR, A.; VERMA, P.; SRIVASTAVA, A.; SAHA, S.; BADU, R.; PANT, M. C.; MANI, V. P. Quality protein



maize for nutritional security: rapid development of short duration hybrids through molecular marker assisted breeding. *Current Science*, v. 96, n. 2, p. 230-237, 2009.

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.

HOTZ, C.; MCCLAFFERTY, B.; HAWKES, C.; RUEL, M.; BABU, S. From harvest to health: Challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 28, p. S271–S279, 2007.

ORTIZ-MONASTERIO, J.I.; PALACIOS-ROJAS, N.; MENG, E.; PIXLEY, K.; TRETOWAN, R.; PENNA, R.J. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Cereal Science*, v. 46, p. 293–307, 2007.

PAES, M. C. D.; GUIMARÃES, P. E. O.; SCHAFFERT, R. E. (2006). Perfil de carotenoides em linhagens elite de milho. 26º Congresso Nacional de milho e sorgo. Inovando para sistemas integrados de produção, 27 a 31 de agosto de 2006. Belo Horizonte, MG. ABMS - 638p.

ROCHEFORD, T.R. Power point presentations. Disponível em: <<http://www.cropsci.uiuc.edu/faculty/rocheford/>>. Acesso: 10 de janeiro de 2008.

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

RODRIGUES, M. C. (2000). Heterose e seus componentes em cruzamentos de populações de milho com alta qualidade protéica. Tese de Doutorado. Escola de Agronomia. Goiânia, Goiás. 232 p.

SÁVIO, F.L.; FARIA, P.N.; PEREIRA, W.A.; BORÉM, A.; TARDIN, F.D.; RODRIGUES, J.A.S.; SCHAFFERT, R.E. Divergência genética em híbridos de sorgo cultivados sob diferentes níveis de fósforo, em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.7, n.3, p. 305-321, 2008.

WHITE, P.J.; BROADLEY, M.R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - Iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytology*, v. 182, p. 49–84, 2009.

