

## Diversidade genética estimada por marcadores Microssatélites entre linhagens elite de milho e associação com heterose<sup>1</sup>

Eloise Fernandes<sup>2</sup>, Ivan Schuster<sup>2</sup>, Elisa Serra Negra<sup>3</sup>, Tereza Aparecida da Silva<sup>4</sup>, Hingrid Ariane da Silva<sup>5</sup>, Alessandra Guedes Baleroni<sup>6</sup>, Carlos Alberto Scapim<sup>7</sup>

### Resumo

Neste trabalho, foram utilizados marcadores moleculares (microssatélites), para analisar a diversidade genética entre 48 linhagens elite de milho do banco de germoplasma da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola - Coodetec e estimar a correlação entre a distância genética e a heterose. Quarenta e quatro *primers* aleatórios resultaram na amplificação de 124 fragmentos polimórficos com média de 2,8 alelos por loco. Os valores do Conteúdo de Informação do Polimorfismo variaram de 0,04 (Bnlg1350) até 0,71 (Umc1005), com valor médio de 0,42, assim, pode-se inferir, que as 48 linhagens analisadas apresentam elevada variabilidade genética. A análise de agrupamento revelou a divisão das linhagens em três grupos. A distância genética média registrada entre as linhagens foi de 0,51, sendo a menor distância 0,27 (LIN-30 x LIN-31) e a maior distância 0,67 (LIN-25 x LIN-38). As estimativas de heterose em relação à média dos pais variaram de 611,5 kg ha<sup>-1</sup> (LIN-32 x LIN-14) a 9317,0 kg ha<sup>-1</sup> (LIN-47 x LIN-14), o que confirma grande variabilidade genética entre os híbridos. Os valores médios de produtividade e heterose foram maiores entre as linhagens pertencentes ao mesmo grupo de divergência. Pode-se observar, entretanto, que dos três híbridos mais heteróticos dois possuem distância acima da média, semelhante ao observados para a produtividade. Tais resultados demonstram que a utilização dos dados das distâncias extremas obtidas por meio dos marcadores moleculares poderiam orientar os cruzamentos, no sentido de diminuir o trabalho, o que sinaliza a eficiência dos marcadores em estudos de divergência genética.

### Introdução

A avaliação de diversidade genética é frequentemente utilizada pelos melhoristas de milho como uma ferramenta para a seleção das combinações híbridas a serem avaliadas. Os esforços são focados em combinações mais promissoras, ou seja, aquelas entre linhagens pertencentes a grupos heteróticos diferentes. A formação de grupos heteróticos é um método de agrupamento de indivíduos com base na heterose produzida nas combinações híbridas, e costuma ser associada a análise de diversidade.

Vários métodos têm sido descritos para avaliação da diversidade genética. Laborda et al. (2005) afirmam que estimativas de divergência genética entre linhagens, por meio de marcadores moleculares, contribuem para poupar esforços de polinizações manuais, possibilitam a obtenção de grupos heteróticos e direcionam os cruzamentos na tentativa de se obter híbridos produtivos e vigorosos.

Bruel et al. (2006), e Guimarães et al. (2007) observaram relação direta entre divergência genética das linhagens de milho e a produtividade dos híbridos, confirmando a hipótese de que a divergência genética das linhagens está diretamente relacionada ao desempenho dos híbridos e é eficiente em prevêê-lo.

O objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores moleculares microssatélites para avaliar a diversidade genética entre um conjunto de 48 linhagens tropicais de milho do Brasil, e relacionar a diversidade com a heterose e produtividade dos híbridos obtidos entre as linhagens.

### Material e Métodos

Foram utilizadas 48 linhagens do programa de melhoramento de milho da Coodetec e 224 híbridos entre estas linhagens. Os grupos heteróticos das 48 linhagens endogâmicas de milho foram anteriormente definidos

<sup>1</sup> Parte da tese de doutorado do primeiro autor

<sup>2</sup> Coodetec –Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola, CEP 85813-450, Cascavel-PR. e-mail: eloise.hf@gmail.com; ivan@coodetec.com.br

<sup>3</sup> Embrapa Florestas, Caixa Postal 319, CEP 83411-000 Colombo-PR. e-mail: elisa@cnpf.embrapa.br

<sup>4</sup> Pós-doutoranda do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá. e-mail: teinhabio@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Doutoranda em Agronomia. Universidade Estadual de Maringá. e-mail: hingrid\_ariane@hotmail.com

<sup>6</sup> Mestranda em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá. e-mail:le\_gb@hotmail.com

<sup>7</sup> Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. Universidade Estadual de Maringá. e-mail:cascapim@uem.br

em ensaios Topcross realizados em safras anteriores no Centro de Pesquisas da Coodetec em Cascavel – PR. O delineamento experimental utilizado foi de blocos completos casualizados com duas repetições.

Para o ensaio de híbridos, foram utilizados 224 híbridos simples, obtidos a partir da combinação entre linhagens de grupos heteróticos distintos do grupo de linhagens avaliadas. O ensaio de avaliação dos híbridos foi conduzido sem repetição e sem controle ambiental.

Foram obtidas as produtividades de cada híbrido e de cada linhagem, corrigida para 13% de umidade e convertida para kg/ha. A heterose foi obtida pela diferença entre a produtividade do híbrido e a média das produtividades das duas linhagens parentais.

O DNA foi isolado de acordo com o método descrito por DOYLE & DOYLE (1990) e quantificado por absorbância a 260nm em espectrofotômetro Nanodrop1000. A amplificação dos SSR seguiu um programa do tipo *Touch Down* e a visualização dos produtos da PCR foi feita em géis de agarose 4%, corados com brometo de etídeo.

A diversidade genética de cada loco microssatélite foi obtida por meio da frequência dos alelos e a distância genética foi calculada pelo complemento do coeficiente de coincidência simples, para dados codominantes e multialélicos, utilizando o programa computacional Genes (CRUZ, 2001). Esse índice foi obtido por meio da divisão do total de alelos comuns entre duas linhagens pelo número total de alelos avaliados em cada indivíduo.

Com base na matriz de distância genética, as linhagens foram agrupadas, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, com o auxílio do programa computacional STATISTICA (StatSoft Inc., 1999).

### Resultados e Discussão

Na caracterização molecular das 48 linhagens de milho com 44 *primers* microssatélites (SSR), foram obtidos 124 alelos polimórficos com média de 2,8 alelos por loco. O nível de polimorfismo foi semelhante ao obtido em alguns estudos, tais como o de Wiethölter et al. (2008), que detectaram uma média de 2,7 alelos por loco analisando 33 locos microssatélites, em um estudo da variabilidade genética de milho e Le Clerc et al. (2005), que analisaram 133 cultivares de milho com 51 locos microssatélites e obtiveram média de 2,9 alelos por loco. Menkir et al. (2004), ADEYEMO et al. (2011) e TERRA et al. (2011), encontraram maiores médias, que variam de 3,7 a 5,7 alelos por loco. Tais autores atribuem o alto polimorfismo obtido ao grau de divergência dos genótipos avaliados e ainda relatam que a pré-seleção dos primers, levando-se em conta o número e a qualidade dos produtos de amplificação, pode contribuir para aumentar o polimorfismo.

Os valores de PIC (Conteúdo de Informação do Polimorfismo) para os 44 locos microssatélites de milho variaram de 0,04 (Bnlg1350) até 0,71 (Umc1005), com PIC médio de 0,42. Como o PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório de um marcador e é sinônimo de diversidade genética, pode-se inferir que as 48 linhagens analisadas com os 44 *primers* apresentam elevada variabilidade genética.

A análise de agrupamento, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA, obtida com base na matriz de distância genética, revelou a divisão das linhagens em três grupos (Figura 1). A distância genética média registrada entre as linhagens foi de 0,51, sendo a menor distância 0,27 (LIN-30 x LIN-31) e a maior distância 0,67 (LIN-25 x LIN-38).

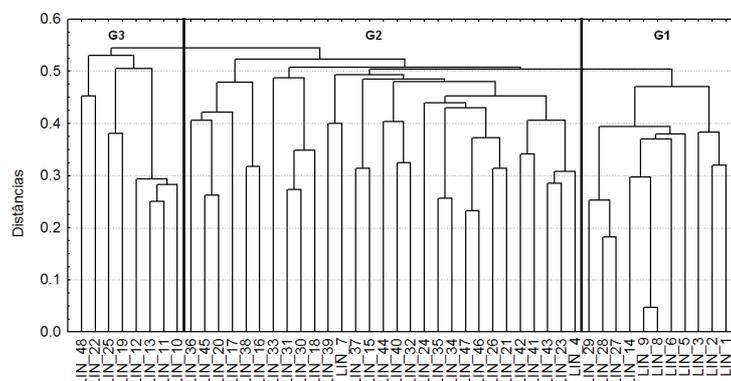


Figura 1 – Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 48 linhagens de milho, a partir da matriz de distância genética obtida através de dados moleculares.

A amplitude das distâncias entre as linhagens foi muito pequena. A maior frequência das distâncias ocorreu no intervalo de 0,4 a 0,6, indicando que os dados de diversidade genética entre as linhagens, obtidos por marcadores moleculares microssatélites, variaram pouco. ADEYEMO et al. (2011) obtiveram uma distância genética média de 0,45 entre os híbridos avaliados.

As estimativas de heterose em relação à média dos pais variaram de 611,5 kg ha<sup>-1</sup> (LIN-32 x LIN-14) a 9317,0 kg ha<sup>-1</sup> (LIN-47 x LIN-14), o que confirma grande variabilidade genética entre os híbridos.

Os valores médios de produtividade e heterose foram maiores entre as linhagens pertencentes ao mesmo grupo de divergência (Figura 2). Desta maneira, não houve relação entre as distâncias genéticas e a heterose ou a produtividade dos híbridos de milho. GUIMARÃES et al. (2007), estudando a correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens, relataram que o híbrido com o maior valor de heterose foi formado por linhagens pertencentes a grupos heteróticos diferentes e o que alcançou o menor valor de heterose, é proveniente da combinação entre duas linhagens do mesmo grupo de diversidade. No entanto, os maiores valores de distância genética não corresponderam aos maiores valores de produtividade de grãos.

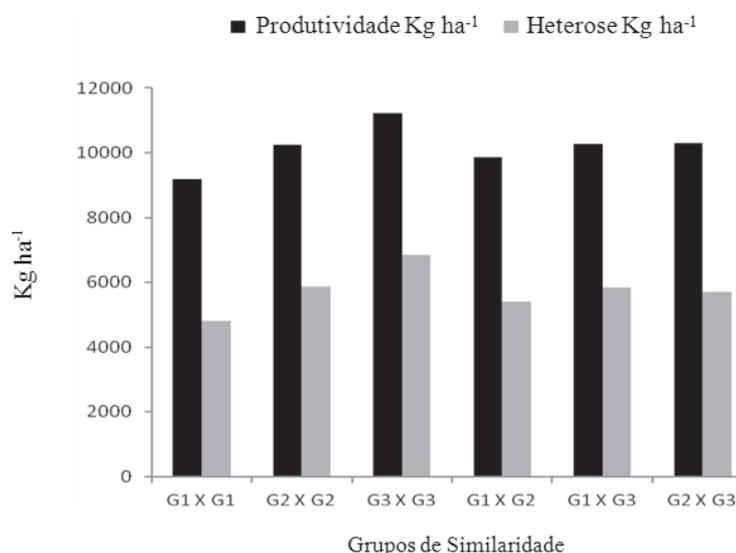


Figura 2 – Médias da produtividade e heterose das linhagens nos distintos grupos de similaridade.

Considerando a distância de 0,51 é possível dividir os dados em dois conjuntos do mesmo tamanho. Entretanto, dos três híbridos mais heteróticos (heterose acima de 9.000 kg ha<sup>-1</sup>), dois possuem distância acima de 0,51. Resultados semelhantes foram observados para a produtividade. Tais resultados demonstram que a utilização dos dados das distâncias extremas obtidas por meio dos marcadores moleculares poderia orientar os cruzamentos, pois se tivessem sido feitos apenas metade dos híbridos, os híbridos mais produtivos e os mais heteróticos teriam sido produzidos. Assim, teria sido possível identificar o melhor híbrido, com a metade do trabalho, o que sinaliza a eficiência dos marcadores em estudos de divergência genética.

Desta forma, o emprego dos marcadores moleculares tem permitido um grande avanço nas pesquisas sobre divergência genética em milho (BENCHIMOL et al., 2000; BARBOSA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; LABORDA et al., 2005; BRUEL, 2006; AGUIAR, 2007). A avaliação da divergência das linhagens por meio de marcadores moleculares pode contribuir substancialmente para poupar esforços de polinizações manuais e possibilitar a obtenção de grupos heteróticos e, posteriormente, alocação de novas linhagens nesses grupos, dirigindo os cruzamentos que possibilitarão a obtenção de híbridos mais produtivos.

## Referências

- ADEYEMO O et al. (2011) Genetic diversity assessment and relationship among tropical-yellow endosperm maize inbred lines using SSR markers. **Maydica**, 56:17-23.
- AGUIAR CG (2007) **Determinação de grupos heteróticos em milho utilizando marcadores moleculares e cruzamentos teste**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 64p. Tese (Doutorado em Agronomia).
- BARBOSA AMM et al. (2003) Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, 130:87-99.
- BENCHIMOL LL et al. (2000) Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance determined by RFLP markers. **Plant Breeding**, 119:491-496.
- Bruel C et al. (2006) Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 41:1491-1498.
- CRUZ CD (2001) **Programa GENES**. Aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV.
- DOYLE JJ and DOYLE JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. 12:13-15.
- GUIMARÃES SP et al. (2007) Correlação da heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:811-816.
- LABORDA PR et al. (2005) Tropical maize germoplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, 111:1288-1299.
- LE CLERC V et al. (2005) Assessing temporal changes in genetic diversity of maize varieties using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 110:294-302.
- MENKIR A et al. (2004) Grouping of tropical mid-altitude maize inbred lines on the basis of yield data and molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108:1582-1590.
- OLIVEIRA KM et al. (2004) Evaluating genetic relationships between tropical maize inbred lines by means of AFLP profiling. **Hereditas**, 140:24-33.
- STASOFT INC (1999) **STATISTICA for Windows [Computer program manual]**. Tulsa: StatSoft.
- TERRA TT et al. (2011) Genetic variability in maize and teosinte populations estimated by microsatellites markers. **Ciência Rural**, 41:205-211.
- WIETHÖLTER P et al. (2008) Genetic variability in corn landraces from Southern Brazil. **Maydica**, 53:151-159.