

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE LINHAGENS DE MILHO UTILIZANDO MICROSSATÉLITES E CORRELAÇÃO COM DESEMPENHO DE HÍBRIDOS SIMPLES

Paula Garcia Meirelles Grassi¹, João Antonio da Costa Andrade², Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva¹, Mario Luiz Teixeira de Moraes³, Paulo César Ceresini⁴

¹Docente da Faculdades Integradas Stella Maris de Andradina (SP).

²Docente do Departamento de Biologia e Zootecnia - UNESP Campus Ilha Solteira (SP).

³Docente do Departamento de Fitotecnia, Tecnologia de Alimentos e Sócio Economia - UNESP Campus de Ilha Solteira (SP).

⁴Docente do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos - UNESP Campus Ilha Solteira (SP).

RESUMO: O sucesso nos programas de melhoramento genético de milho depende da identificação de genitores com boa capacidade de combinação para a produção de híbridos e na conservação da variabilidade genética do germoplasma. O emprego de marcadores moleculares pode auxiliar na avaliação da diversidade genética e na predição de híbridos, por meio da estimativa da distância genética. Com esse objetivo foram genotipadas, por marcadores microssatélites, 40 linhagens oriundas dos compostos Dentado e Flintisa e investigada a correlação do desempenho dos híbridos simples interpopulacionais com as distâncias genéticas entre suas linhagens. Verificou-se diversidade genética nos dois grupos de linhagens, permitindo a separação em grupos heteróticos distintos, mas sem concordância total com os dados de genealogia. As correlações entre performance dos híbridos e distância genética das linhagens foram baixas, indicando que altos níveis de distância genética entre linhagens é condição necessária, mas não suficiente para que seus híbridos exibam as melhores performances.

Palavras-chave: Microssatélites. Marcadores moleculares. Grupos heteróticos. Dialelo parcial circulante.

GENETIC DIVERGENCE AMONG MAIZE LINES USING MICROSATELLITES AND CORRELATION WITH SINGLE CROSS HYBRIDS PERFORMANCE

ABSTRACT: Success inbreeding programs for corn depends on the identification of parents with good combining ability for hybrid synthesis and conservation of the genetic variability of germplasm. The use of molecular markers may help to assess the genetic diversity and hybrid prediction, by estimating the genetic distance. With this objective were genotyped, for microsatellite markers, 40 inbred lines derived of Dentado and Flintisa composites and investigated the correlation between performance of interpopulation single-cross hybrids with the genetic distances between their lines. There was genetic diversity in both groups of inbred lines, allowing the separation into distinct heterotic groups, but not total agreement with the genealogical data. The correlations between performance of hybrids and genetic distance of inbred lines were low, indicating that high levels of genetic

distance between inbred lines, measured by the markers used, is necessary but not sufficient for their hybrids exhibit the best performances.

Key words: Molecular markers. Heterotic groups. Genetic correlation. Partial circulant diallel.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das espécies mais extensivamente cultivadas no Brasil, atingindo área de 15,9 milhões de hectares na safra 2012/13 (CONAB, 2013). Nos programas de melhoramento, a identificação de genitores com boa capacidade de combinação e, conseqüentemente, que produzam bons híbridos, sempre foi um dos pontos de maior interesse dos melhoristas. Além disso, o conhecimento da diversidade do germoplasma é crucial para o planejamento da produção de híbridos e conservação da variabilidade genética.

Com a introdução do conceito de capacidade geral e específica de combinação na década de 40 (SPRAGUE; TATUM, 1942), os esquemas de cruzamentos dialélicos começaram a ser estudados e muito contribuíram para a avaliação do comportamento de linhagens em cruzamento, sendo muito usados no melhoramento de milho, mostrando-se eficientes também para detectar divergências genéticas entre linhagens e alocar estas em grupos heteróticos distintos (HALLAUER, 1990; BORÉM; MIRANDA, 2009).

A capacidade geral de combinação (CGC) refere-se à habilidade de um genótipo produzir progênes com dado comportamento, quando cruzado com uma série de outros genitores. Em termos puramente estatísticos é o desvio da média dos cruzamentos de um genótipo em relação à média geral dos cruzamentos possíveis dentro de um grupo ou entre dois grupos de genótipos parentais. A capacidade específica de combinação (CEC) refere-se ao comportamento de um cruzamento específico, que pode desviar do comportamento esperado com base apenas na CGC. Os conceitos de CGC e CEC são úteis na caracterização das linhagens em cruzamentos, sendo que a CGC está associada a genes de efeito aditivo e a CEC depende basicamente de genes de efeito não aditivo (dominância e epistasia). Esses conceitos, assim como estimativas de heterose estão sendo aplicados para diversos caracteres como resistência à cercóspera (ENGELSING et al., 2011), capacidade de expansão em milho pipoca (BARRETO et al., 2012) e rendimento de grãos (FIDELIS et al., 2010; BERNINI et al., 2012).

Com o desenvolvimento das técnicas baseadas em marcadores moleculares, muitos estudos vêm sendo realizados para avaliar a diversidade genética dos materiais em melhoramento e o potencial da predição de híbridos pela estimativa da distância genética (AJMONE-MARSAN et al., 1998; BARBOSA et al., 2003; BENCHIMOL et al., 2000; BERNARDO, 1992).

O uso de marcadores moleculares para estimar divergência entre linhagens tem sido sugerido como uma estratégia para transpor as dificuldades de avaliação, em campo, do

grande número de cruzamentos possíveis para a predição do desempenho de híbridos simples (SU-XIA et al., 2004; LABORDA et al., 2005; PATERNIANI et al., 2008). Uma vez que o comportamento de híbridos depende da diversidade genética entre os parentais, abriu-se a possibilidade da identificação de bons híbridos apenas com a caracterização genética das linhagens (LANZA et al., 1997).

Diversos estudos demonstraram correlação significativa entre distância genética baseada em microsatélites (SSR) e genealogia, tornando este tipo de marcador molecular uma alternativa promissora na análise da estrutura genética de populações de milho (LIU et al. 2003; PINTO et al., 2003; VAZ PATTO et al., 2004; GARCIA et al., 2004).

O objetivo do presente estudo foi, a partir do emprego de marcadores moleculares (SSR), verificar a diversidade genética entre e dentro de grupos de linhagens oriundas dos compostos Dentado e Flintisa, alocá-las em diferentes grupos heteróticos em função de suas distâncias genéticas e investigar a correlação do desempenho dos híbridos simples interpopulacionais com as distâncias genéticas entre as linhagens.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção e avaliação dos híbridos

Foram empregadas 20 linhagens oriundas do Composto Flintisa e 20 oriundas do Composto Dentado. Estes compostos fazem parte de um programa de melhoramento para condição de baixa tecnologia, em andamento na UNESP – Campus de Ilha Solteira.

Para a produção dos híbridos simples foi realizado um dialelo parcial circulante, onde cada linhagem foi cruzada com quatro linhagens da população contrastante, obtendo-se uma amostra de 80 híbridos simples dos 400 possíveis no dialelo parcial. Estes híbridos, mais a testemunha comercial (híbrido simples Dow 2B710), foram avaliados em um látice 9 x 9, com quatro repetições. Foram avaliados os caracteres agrônômicos dias para florescimento feminino (FF, contados a partir da emergência até que 50% das plantas da parcela tivessem estigmas emitidos), altura de plantas (AP, em metros, do nível do solo até a inserção da folha bandeira, como média de cinco plantas da parcela), altura de espigas (AE, em metros, do nível do solo até a inserção da espiga superior, como média de cinco plantas da parcela), enfezamento vermelho (CS – *corn stunt*), porcentagem de plantas com sintomas, 30 dias após florescimento), nota geral para doenças (NG, escala de 0 – todas as plantas da parcela completamente doentes - a 5 – todas as plantas da parcela completamente saudas, não importando quais doenças ocorressem), infecção por pinta branca (PB, escala de notas de 0 a 5), porcentagem de acamamento (AC), porcentagem de quebramento (QB), porcentagem de espigas doentes (ED), prolificidade (PR), grãos ardidos (GA, escala de notas de 0 a 5) e rendimento de grãos (RG corrigido para 13% de umidade e estande ideal de 50 plantas por parcela). A parcela experimental constituiu-se de duas linhas de 5 m, espaçadas de 0,85 m.

A eficiência do látice foi calculada para verificação da possibilidade de realização da análise estatística seguindo o delineamento de blocos ao acaso e foi estimada a capacidade geral de combinação de cada linhagem pelo método dos quadrados mínimos, baseado no

modelo $Y_{ij} = m + g_i + g_j$, onde Y_{ij} é o rendimento médio do híbrido entre a linhagem i e a linhagem j , m é a média geral dos híbridos envolvidos, g_i é a capacidade geral de combinação (CGC) da linhagem i e g_j a CGC da linhagem j . Com os valores da CGC estimou-se a média dos 400 híbridos simples possíveis, de acordo com Miranda Filho e Vencovsky (1999). Para tais procedimentos foi utilizado o *software* GENES, versão 2007.0.0 (CRUZ, 1997).

Genotipagem dos locos SSR e análise da diversidade genética

O DNA de cada uma das 40 linhagens foi extraído a partir de “bulks” de folhas de 10 plantas, utilizando-se procedimento proposto por Doyle e Doyle (1990). Para a genotipagem dos locos SSR, foram selecionados 20 pares de *primers* pertencentes ao Maize GDB (www.maizegdb.org). As reações de PCR foram conduzidas de acordo com Pinto et al. (2003) e submetidas a termociclagem nas condições ajustadas por Ogliari et al. (2000). Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo.

A diversidade genética em cada população foi estimada agrupando todas as linhagens, sendo avaliados os seguintes parâmetros: número total de alelos (k), riqueza alélica (R), alelos privados, heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Os desvios do EHW foram testados pelos valores individuais dos locos para o índice de fixação em cada grupo de linhagens utilizando-se um teste exato de Fisher e 10000 permutações com correção de *Bonferroni* (95%, $\alpha=0,05$) para evitar falsos positivos. Para estas análises foram empregados os programas FSTAT, versão 2.9.3.2. (GOUDET, 2002) e GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

Análise da distância genética e correlação com o desempenho dos híbridos

As distâncias genéticas entre todos os possíveis pares de linhagens (Flintisa x Dentado) foram calculadas a partir das frequências alélicas dos locos SSR, usando a distância genética de Rogers (1972), empregando-se o *software Tools for Population Genetics Analyses* (TFPGA) versão 1.3 (MILLER, 1997). A análise de agrupamento em grupos heteróticos foi conduzida a partir das distâncias genéticas pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithimetical Means) empregando-se o *software* Mega4 (TAMURA et al., 2007).

A partir dos resultados de caracterização molecular e de caracterização quantitativa, o coeficiente de correlação de Pearson foi calculado entre as distâncias genéticas das linhagens parentais e desempenhos preditos e observadas de seus híbridos simples, conforme descrito por Benchimol et al. (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversidade genética

A maioria dos pares de *primers* (18/20) inicialmente selecionados resultou em adequada amplificação, exceto phi001 e bnlg1450 que falharam na amplificação de todas as

linhagens, resultando em alelos nulos e, conseqüentemente, não foram empregados nas análises. A ocorrência de alelos nulos é amplamente conhecida e reportada nos estudos de genética, sendo decorrente de complementariedade insuficiente entre o *primer* e a molécula de DNA molde, pela presença de pontos de mutação, impossibilitando a amplificação daquele loco (WAGNER et al., 2006). Provavelmente ocorrem diferenças genômicas entre os sítios de pareamento desses *primers* levando-se em consideração que eles foram desenhados para germoplasma temperado e não tropical como aqui estudado. Outros autores também já relataram alelos nulos em milho (LABORDA et al., 2005; DANDOLINI et al. 2008).

Sobre a amostra total de linhagens (40 genótipos), todos os 18 locos SSR foram polimórficos, sendo observados um total de 117 alelos (Tabela 1), indicando alto nível de polimorfismo. O número de alelos por loco variou de 3 (ϕ 059) a 13 alelos (ϕ 299852), com média de 6,5. O menor fragmento alélico obtido foi de 66 pb (loco ϕ 064) e o maior, com 240 pb, foi encontrado no loco ϕ 453121. A riqueza alélica por loco foi inferior ao número de alelos por locos, variando de 2,92 (ϕ 059) a 10,72 alelos (ϕ 299852), com média de 5,74. Este menor número efetivo de alelos por loco indica que muitos dos alelos têm baixa frequência ($p \leq 0,5$) ou são raros ($p \leq 0,05$).

Em todos os locos os valores de heterozigidade observada (H_o) foram baixos e inferiores aos valores esperados (H_e). A H_e variou de 0,51 (ϕ 233376) a 0,85 (ϕ 126 e $\text{bnlg}2291$), com média de 0,70, enquanto que a H_o variou de 0,00 (ϕ 453121, ϕ 233376, $\text{bnlg}127$, $\text{bnlg}128$ e ϕ 059) a 0,16 ($\text{bnlg}2291$), com média de 0,06. Cerca de 28% dos locos (ϕ 453121, ϕ 233376, $\text{bnlg}127$, $\text{bnlg}128$ e ϕ 059) apresentaram-se fixados o que pode ser verificado pelos valores nulos de H_o e pelo valor unitário do índice de fixação (F) (Tabela 1). Os demais locos também apresentaram altos índices de fixação, variando entre 0,83 ($\text{umc}1823$) e 0,97 (ϕ 072 e ϕ 059), com média de 0,92. Todos os locos apresentaram desvios significativos ($p < 0,05$) do EHW, por excesso de homozigotos, confirmando o nível máximo de endogamia a que as populações foram submetidas para a extração das linhagens. Entretanto para diversos locos ainda não foi atingido o estado absoluto de homozigose. Fenômeno semelhante foi observado por Laborda et al. (2005) para 50 locos SSR em 85 linhagens de milho tropical mantidas por autofecundações por várias gerações. Verificaram a presença de heterozigose em 96% desses locos, sendo que cinco apresentaram alta frequência de heterozigotos (>40%). Os autores sugerem que isso demonstra a eficiência da técnica molecular de SSR em detectar se os procedimentos de endogamia são efetivos no aumento da homozigidade nas linhagens e pode indicar também que alguns dos sítios SSR genotipados estão sob seleção. Entretanto não se deve descartar a possibilidade de ocorrência de contaminação de pólen durante as autofecundações.

Há que se considerar que os dois grupos de linhagens diferem não apenas pelas frequências alélicas em cada loco, mas também pela ocorrência de alelos privados. Foram identificados 59 alelos privados, correspondendo a 50,4% do total de alelos amostrados, sendo 31 ocorrentes no grupo Dentado e 28 no Flintisa. A variação de frequências desses alelos foi de 0,025 a 0,588. Dentre os alelos privados 64,5% são raros (frequência < 0,05) nas linhagens Dentado e 50% nas linhagens Flintisa. A presença de alelos privados indica o

surgimento de novas variações genéticas dentro da população, além de ser uma característica de germoplasma tropical. A alta incidência de alelos raros nas duas populações é explicada pelo fato de serem originadas de muitos parentais. Há também que se considerar que estes alelos podem ser resultantes da seleção que está ocorrendo nos materiais, o que pode levar à deriva. A existência de alelos privados torna possível a detecção de regiões genômicas de um tipo específico de milho (PINTO et al., 2003).

Tabela 1. Índices de diversidade genética para a amostra total de linhagens de milho oriundas dos compostos Dentado e Flintisa. N é o número de linhagens amostradas; k é o número total de alelos; R é a riqueza alélica nos locos; H_e é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.

Locos	SSR	Bin*	Amplitude alélica(pb)	N	k	R	H_e	H_o	f
phi064	ATCC	1,11	66-100	38,0	6,0	5,65	0,76	0,03	0,97
umc1823	TG	2,02	80-124	37,0	7,0	6,48	0,79	0,14	0,83
bnlg1138	AG	2,06	154-198	38,0	4,0	3,67	0,55	0,05	0,91
phi453121	ACC	3,00	204-240	37,0	4,0	3,36	0,56	0,00	1,00
bnlg1108	AG	3,08	110-138	40,0	4,0	3,19	0,55	0,08	0,86
phi072	AAAC	4,01	112-142	40,0	5,0	4,96	0,76	0,03	0,97
bnlg2291	AG	4,07	126-220	38,0	9,0	8,18	0,85	0,16	0,82
bnlg105	N.E.**	5,03	80-102	34,0	6,0	5,71	0,74	0,06	0,92
bnlg1346	AG	5,07	128-188	37,0	9,0	7,34	0,81	0,11	0,87
phi126	AG	6,00	108-188	37,0	9,0	8,02	0,85	0,14	0,84
phi299852	AGC	6,07	108-140	33,0	13,0	10,72	0,82	0,12	0,85
phi112	AG	7,01	116-164	36,0	8,0	6,63	0,66	0,03	0,96
phi082	AG	7,06	102-124	37,0	6,0	5,36	0,76	0,03	0,96
bnlg669	N.E	8,03	104-128	39,0	6,0	5,72	0,66	0,05	0,92
phi233376	CCG	8,09	130-148	39,0	5,0	3,97	0,51	0,00	1,00
bnlg127	N.E.	9,02	176-200	37,0	5,0	4,36	0,54	0,00	1,00
bnlg128	N.E.	9,07	146-190	36,0	8,0	7,05	0,81	0,00	1,00
phi059	ACC	10,02	122-136	35,0	3,0	2,92	0,56	0,00	1,00
Médias				37,1	6,5	5,74	0,70	0,06	0,92

*Bin- Localização genômica do marcador SSR nos 10 grupos de ligação gênica do milho, sendo cada grupo dividido em aproximadamente dez bins (www.maizegdb.org). **Sequência não especificada.

Em relação à diversidade intrapopulacional verificou-se que a média de alelos por loco foi de 4,89 (DP=1,75) e 4,78 (DP=2,13) respectivamente para Dentado e Flintisa, com valores de riqueza alélica de 4,78 (DP=1,67) e 4,76 (DP=2,12).

Distância genética e alocação em grupos heteróticos

As distâncias genéticas (DG) entre as linhagens Dentado e Flintisa estão expressas na Tabela 2. A amplitude de variação de DG esteve entre 0,4 e 1,0. Destaca-se o fato de que estes valores foram encontrados apenas para as linhagens F02 e F06, em relação às

linhagens do Dentado. Estas linhagens apresentaram alguns locos com alelos nulos, o que pode ter influenciado as estimativas de DG. Alelos nulos podem afetar as análises de estrutura e diversidade genética, caso a frequência dos mesmos seja alta. Isso não ocorreu nas populações estudadas, de forma que pode-se esperar poucos efeitos sobre estimativas de diversidade.

Tabela 2. Distâncias genéticas entre as linhagens das populações Dentado e Flintisa, computadas a partir de dados SSR.

Linhagens	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20
F01	0,86	0,72	0,70	0,70	0,68	0,61	0,62	0,81	0,82	0,54	0,67	0,85	0,65	0,75	0,80	0,75	0,72	0,88	0,87	0,64
F02	0,97	0,60	0,80	0,80	0,80	0,60	0,60	1,00	0,80	0,40	0,60	0,80	0,60	1,00	0,80	0,80	0,60	0,80	0,75	0,60
F03	0,68	0,74	0,78	0,91	0,74	0,82	0,77	0,86	0,82	0,81	0,87	0,78	0,83	0,72	0,81	0,81	0,72	0,78	0,81	0,68
F04	0,86	0,74	0,71	0,87	0,78	0,79	0,83	0,88	0,75	0,73	0,91	0,88	0,87	0,94	0,87	0,89	0,78	0,88	0,69	0,71
F05	0,92	0,80	0,84	0,93	0,78	0,81	0,79	0,99	0,81	0,73	0,87	0,88	0,81	0,89	0,87	0,83	0,73	0,82	0,75	0,71
F06	0,79	0,80	0,77	1,00	0,83	0,67	0,67	1,00	0,80	0,75	1,00	0,98	0,81	1,00	0,98	0,67	0,62	0,83	0,67	0,81
F07	0,85	0,85	0,85	0,96	0,81	0,92	0,70	0,87	0,93	0,77	0,90	0,75	0,80	0,75	0,86	0,81	0,64	0,87	0,79	0,59
F08	0,88	0,57	0,77	0,72	0,69	0,86	0,86	0,87	0,79	0,79	0,80	0,80	0,61	0,75	0,80	0,88	0,84	0,93	1,00	0,67
F09	0,78	0,91	0,86	0,87	0,78	0,96	0,92	0,94	0,94	0,93	0,87	0,71	0,74	0,72	0,80	0,83	0,76	0,71	0,81	0,80
F10	0,64	0,84	0,67	0,71	0,65	0,77	0,68	0,79	0,75	0,80	0,74	0,70	0,62	0,59	0,82	0,71	0,54	0,50	0,67	0,68
F11	0,78	0,78	0,73	0,71	0,61	0,71	0,87	0,83	0,75	0,73	0,76	0,71	0,62	0,67	0,74	0,83	0,74	0,76	0,75	0,63
F12	0,60	0,83	0,72	0,77	0,71	0,65	0,60	0,82	0,93	0,57	0,80	0,76	0,72	0,53	0,79	0,53	0,45	0,69	0,53	0,79
F13	0,59	0,82	0,64	0,58	0,58	0,70	0,77	0,63	0,86	0,85	0,59	0,69	0,54	0,58	0,60	0,62	0,67	0,59	0,66	0,78
F14	0,68	0,84	0,73	0,71	0,65	0,65	0,68	0,79	0,69	0,80	0,78	0,76	0,74	0,71	0,70	0,59	0,54	0,56	0,53	0,76
F15	0,64	0,92	0,72	0,73	0,82	0,71	0,67	0,76	0,94	0,79	0,78	0,93	0,68	0,71	0,75	0,53	0,59	0,75	0,60	0,79
F16	0,66	0,93	0,61	0,71	0,61	0,73	0,57	0,66	0,88	0,80	0,64	0,77	0,64	0,61	0,63	0,56	0,64	0,53	0,56	0,71
F17	0,64	0,79	0,62	0,56	0,65	0,56	0,52	0,58	0,73	0,86	0,87	0,79	0,66	0,76	0,85	0,65	0,67	0,81	0,53	0,75
F18	0,68	0,99	0,67	0,73	0,61	0,67	0,76	0,77	0,81	0,80	0,64	0,81	0,68	0,78	0,71	0,67	0,69	0,53	0,63	0,71
F19	0,60	0,87	0,55	0,59	0,61	0,65	0,55	0,60	0,81	0,93	0,64	0,71	0,59	0,61	0,65	0,50	0,64	0,53	0,50	0,71
F20	0,59	0,85	0,68	0,68	0,68	0,68	0,63	0,79	0,90	0,89	0,84	0,76	0,63	0,68	0,72	0,56	0,59	0,66	0,59	0,72

O dendrograma (Figura 1) gerado pela análise de agrupamento das linhagens em função de suas distâncias genéticas, evidenciou a formação de quatro grupos heteróticos nomeados de GI, GII, GIII e GIV. Os grupos GI e GII reuniram o maior número de linhagem (14 em cada um) seguidos pelo GIII com 8 linhagens e GIV com 4 linhagens. O grupo heterótico GI reuniu quase que exclusivamente linhagens oriundas do composto Dentado (93% - 13/14). As linhagens Flintisa ficaram alocadas com maior predominância nos grupos GII, GIII e GIV nas proporções de 57% (8/14), 100% (8/8) e 75% (3/4), respectivamente.

A menor distância genética entre linhagens dentro do mesmo grupo foi observada para o GII (Figura 1), que é o grupo heterótico com presença quase equifrequente de linhagens Dentado e Flintisa. Esses resultados indicam que, nos diferentes locos estudados, há um compartilhamento de alelos entre os dois grupos de linhagens e, como consequência, há a probabilidade de que ao se cruzar linhagens interpopulacionais Flintisa x Dentado, sejam produzidos híbridos que apresentem um número de locos heterozigóticos inferior ao que se esperaria nos cruzamentos de linhagens altamente contrastantes. Consequentemente o

desempenho desses híbridos pode ficar aquém do desejado, pois a heterose será menor.

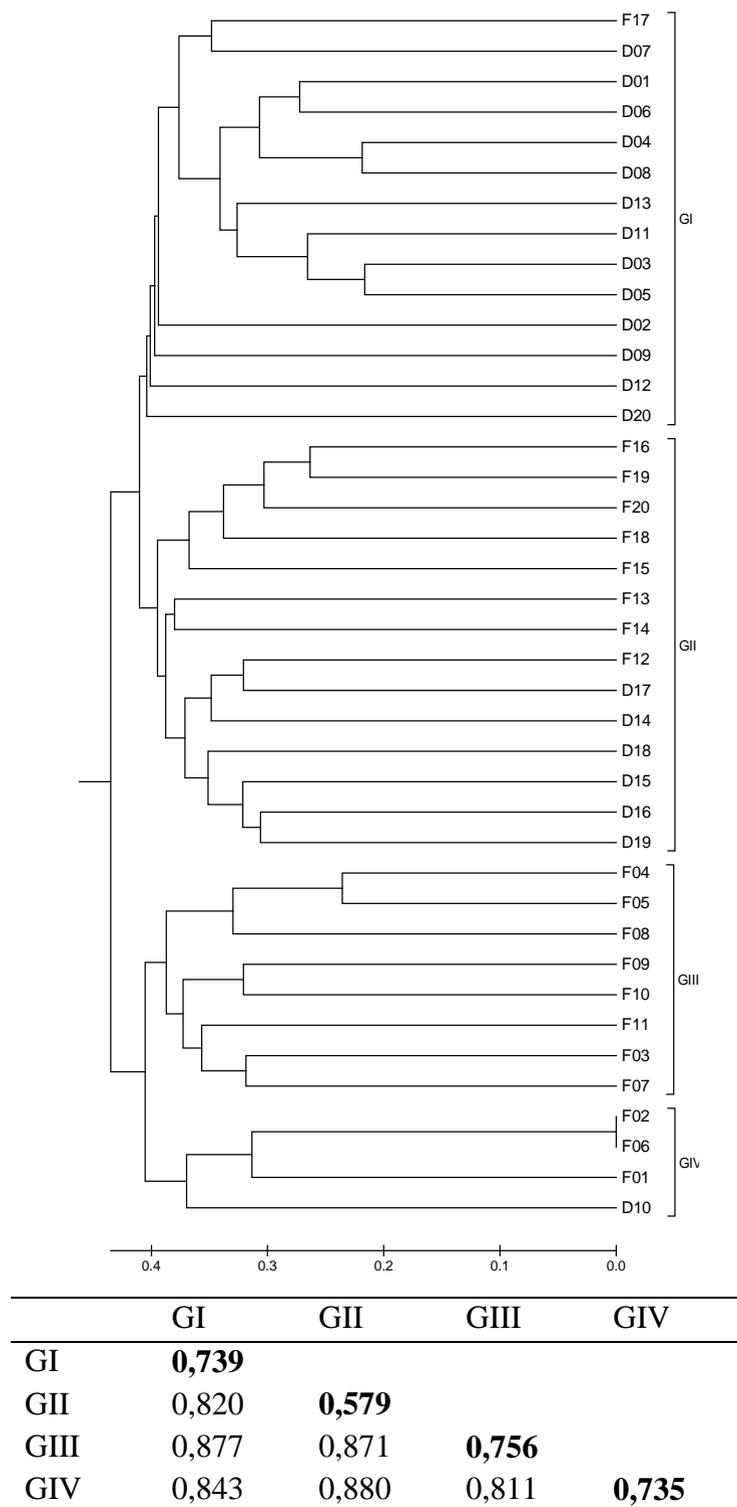


Figura 1. Dendrograma das linhagens de milho das populações Dentado e Flintisa, gerado a partir da distância de Rogers (1972), pelo método de UPGMA. (GI, GII, GIII e GIV – grupos heteróticos e as distâncias genéticas médias entre e dentro dos grupos).

O germoplasma brasileiro teve origem de uma ampla base genética e as populações

formadas, mesmo sendo contrastantes, podem ter parte de seu germoplasma em comum. Isso pode explicar a presença de linhagens oriundas das duas populações colocadas em um mesmo grupo do dendrograma. Este fator pode ocasionar a falta de correlação entre os dados moleculares e de genealogia. Marcadores moleculares capazes de identificar níveis maiores de polimorfismos, como os SSR, são mais eficientes no estudo da real variabilidade genética entre genótipos e também na distinção destes para fins de melhoramento. O alto nível de polimorfismos não é ideal na análise genealógica, uma vez que alelos múltiplos podem ser gerados devido a eventos de *slipage* (LABORDA et al., 2005). Esta divergência entre o dendrograma e os dados genealógicos indica a possibilidade de o germoplasma tropical não se comportar como o temperado e a necessidade de aprofundamento dos conhecimentos a respeito do germoplasma brasileiro.

Desempenho dos híbridos e correlação com distância genética das linhagens parentais

A análise estatística foi realizada seguindo o delineamento em blocos ao acaso, que também serviu de base para as estimativas de todos os demais parâmetros, uma vez que a eficiência do látice foi muito baixa.

Os resultados obtidos na avaliação dos híbridos observados e preditos e a correlação entre a distância genética e a média destes híbridos estão expressos na Tabela 3. Para FF, CS, AC, QB, ED, PR e GA a correlação foi negativa, enquanto que AP, AE, DF, PB e RG esta correlação foi positiva, porém baixa. Paiva (2002) também encontrou correlação negativa entre DG dos progenitores e desempenho de híbridos de melão para os caracteres número de frutos por planta e a densidade do fruto. Os autores sugerem que a ineficiência da predição do caráter pode ser atribuída aos efeitos genéticos não aditivos.

Tabela 3. Intervalo de variação entre os híbridos, médias e correlação com distâncias genéticas (DG) de 400 híbridos de milho (observados e preditos), para 12 caracteres.

Caracteres	Intervalo de variação	Média	Correlação com DG	Probabilidade >P
Florescimento feminino (dias)	53,7 – 62,7	59,5	-0,0127	0,8000
Altura de planta (m)	1,64 – 2,49	2,09	0,14067	0,0045**
Altura de espiga (m)	0,85 – 1,56	1,20	0,057573	0,2322
Cornstunt (%)	2,0 – 40,0	17,5	-0,07613	0,1285
Nota geral doenças foliares	2,2 – 5,0	3,3	0,067351	0,1788
Nota pinta branca	2,0 – 5,0	3,3	0,067351	0,1788
Acamamento (%)	0 – 36,15	8,6	-0,12045	0,0159*
Quebra (%)	0 – 32,31	6,4	-0,00303	0,9518
Espigas doentes (%)	12,4 – 92,1	53,4	-0,09859	0,0488*
Prolificidade	0,5 – 1,97	0,95	-0,14508	0,0036**
Nota grãos ardidos	3,9- 5,0	4,8	-0,14286	0,0042**
Rendimento (t/ha)	3,17 – 7,79	5,45	0,088639	0,0574

*Significativo a 5% de probabilidade; **Significativo a 1% de probabilidade.

As correlações foram significativas para os caracteres AP, AC, ED, PR e GA, porém de baixa magnitude, o que indica a ineficiência da identificação de bons híbridos pela distância genética baseada nos marcadores SSR. Paterniani et al. (2008) e Barbosa et al. (2003) consideram que a predição do desempenho de híbridos tem maior sucesso quando se empregam cruzamentos intrapopulacionais. A baixa correlação da DG das linhagens com o desempenho dos híbridos interpopulacionais pode ser decorrente da menor variação da distância genética (PATERNIANI et al., 2008). Altas estimativas para a divergência genética entre os genitores não implica na expressão de altos valores para a CEC ou para a heterose. Assim, não é possível fazer inferências sobre a heterose a partir da divergência genética entre os genitores envolvidos (MELO et al., 2001). Também a correlação entre distâncias genéticas e médias de híbridos pode ser baixa quando essas médias dependem fortemente de locos em homozigose para alelos com efeitos aditivos favoráveis. Baixas correlações entre distância genética de linhagens de milho e heterose de seus híbridos foram obtidos por Guimarães et al. (2007). No presente estudo a correlação entre rendimento de grãos e distância genética foi positiva, porém não significativa. Lorencetti et al. (2006) também não encontraram correlação significativa entre dissimilaridade genética, obtida por marcadores AFLP e desempenho de híbridos de aveia.

A principal justificativa para correlações reduzidas entre as distâncias medidas com auxílio de marcadores e o desempenho dos híbridos, tem sido a provável utilização de marcadores não associados geneticamente com regiões cromossômicas responsáveis pela manifestação da heterose (CHARCOSSET et al., 1991). Quando esses marcadores estão associados a locos com alelos favoráveis de efeito aditivo que se encontram em homozigose no híbrido, isso também não é contado para a distância, pois as linhagens são homozigóticas idênticas para os mesmos. No entanto esses locos aumentam as médias dos híbridos, provocando menor correlação destas com a distância genética das linhagens parentais. Dessa forma, a escolha dos marcadores adequados é uma etapa de extrema importância nestes estudos, porém ainda de difícil solução. Segundo Bernardo (1992), para uma efetiva predição do desempenho de híbridos, utilizando marcadores moleculares, deve-se respeitar as condições de forte efeito de dominância, alta herdabilidade e ligação entre os marcadores moleculares e QTLs.

Mohammadi et al. (2002) relatam que a maioria dos QTLs para rendimento e seus componentes tem efeito sobredominante. Guimarães et al. (2007) reportam que a baixa correlação encontrada em seu estudo se deve aos fatos de os marcadores utilizados não estarem associados a QTLs e o rendimento de grãos ser um caráter de baixa herdabilidade.

A literatura traz enorme quantidade de análises sobre o milho de clima temperado, as quais praticamente saturam questões sobre a diversidade dessa classe de germoplasma (SIBOV et al., 2003). Todavia, o milho tropical, dispersor originário da variabilidade em todo o mundo, ainda não tem consolidada a classificação de suas reservas genéticas.

Os dados obtidos neste trabalho indicam a existência de diversidade genética nos dois grupos de linhagens (Dentado e Flintisa), o que as qualifica para emprego na obtenção de híbridos. A separação das linhagens em grupos heteróticos indicou uma divergência entre os

grupos obtidos por marcadores moleculares e pela origem (genealogia). A alocação de linhagens de diferentes origens (Dentado ou Flintisa) em um mesmo grupo heterótico é um indicativo do compartilhamento de alelos entre essas populações. A alta incidência de alelos privados indica que as populações também possuem *pools* gênicos exclusivos. As correlações entre o desempenho de híbridos e a distância genética de linhagens não foram altas, indicando que altos níveis de DG entre linhagens parentais é condição necessária, mas não suficiente para que seus híbridos exibam os melhores desempenhos. Os baixos valores de correlações encontrados podem ser explicados pelo fato de que a maioria dos caracteres é de baixa herdabilidade (exceto AP e AE), à possível ausência de ligação entre os marcadores e os locos que controlam esses caracteres e à possível ligação dos marcadores com alelos com efeitos aditivos que estão em homozigose idêntica nas linhagens parentais. Mesmo baixas essas correlações foram significativas para AP, AC, ED, PR e GA.

Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos a respeito dos germoplasmas brasileiro e tropical, que têm demonstrado comportamento diferente do germoplasma temperado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração financeira da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Programa PRODOC-CAPES) e à Dra. Ester Wickert (EPAGRI/Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) pelo auxílio na utilização do software MEGA 4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJMONE-MARSAN, P.; CASTIGLIONI, P.; FUSARI, P.; KUIPER, M.; MOTTO, M. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p.219-227, 1998.

BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; BENCHIMOL, L. L.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA JÚNIOR., C. L.; SOUZA, A. P. Relationship of intra- and interpopulation tropical maize single cross hybrid performance and genetic distances computed from AFLP and SSR markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, n. 1, p.87-99, 2003.

BARRETO, R. R.; SCAPIM, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; RODOVALHO, A. A.; VIEIRA, R. A.; SCHUELTER, A. R. Avaliação da capacidade de combinação de famílias S₂ de milho-pipoca por meio de diferentes testadores. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p.873-890, 2012.

BENCHIMOL, L. L.; SOUZA JR., C. L.; GARCIA, A. A. F.; KONO, P. M. S.; MANGOLIN, C. A.; BARBOSA, A. M. M.; COELHO, A. S. G.; SOUSA, A. P. Genetic diversity in tropical maize inbred lines: heterotic group assignment and hybrid performance

determined by RFLP markers. **Plant Breeding**, Westport, v. 119, n. 6, p.491-496, 2000.

BERNARDO, R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, p.628-634, 1992.

BERNINI, C. S.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Estimativas de parâmetros de heterose em híbridos de populações F₂ de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p.56-62, 2012.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009. cap. 31, p. 434-452.

CHARCOSSET, A.; LEFORT-BUSON, M.; GALLAIS, A. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 81, p.571-575, 1991.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra Brasileira – grãos, 12º levantamento** – setembro/2013. Brasília: CONAB, 2013. 30 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_10_16_14_32_01_boletim_portugues_-_setembro_2013.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2014.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.

DANDOLINI, T. S.; SCAPIM, C. A.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; MANGOLIN, C. A.; MACHADO, M. F. P. S.; MOTT, A. S.; LOPES, A. D. Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 8, p.313-320, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p.13–15, 1990.

ENGELSING, M. J.; ROZZETTO, D. S.; COIMBRA, J. L. M., ZANIN, C. G.; GUIDOLIN, A. F. Capacidade de combinação em milho para resistência a *Cercospora zea-maydis*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p.232-241, 2011.

FIDELIS, R. R.; MIRANDA, G. V.; FALUBA, J. S. Capacidade de combinação de populações de milho tropicais sob estresse de baixo nitrogênio. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p.358-366, 2010.

GARCIA, A. A. F. ; BENCHIMOL, L. L.; BARBOSA, A. M. M.; GERALDI, I. O.; SOUZA JÚNIOR., C. L.; SOUZA, A. P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genetics and Molecular Cultura Agronômica**, Ilha Solteira, v.24, n.1, p.1-16, 2015

Biology, Ribeirão Preto, v. 27, n. 4, p.579-588, 2004.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2., 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

GUIMARÃES, P. S.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; LÜDERS, R. R.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M. Correlação de heterose de híbridos de milho com divergência genética entre linhagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p.811-816, 2007.

HALLAUER, A. R. Methods used in developing maize inbreds. **Maydica**, Bergamo, v. 35, n. 3, p.1-16, 1990.

LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; GARCIA, A. A. F.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SOUZA, A. P. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p.1288-1299, 2005.

LANZA, L. L.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; OTTOBONI, L. M. M.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, n. 8, p.1023-1030, 1997.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). 2001. Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 12 abr. 2012.

LIU, K.; GOODMAN, M.; MUSE, S.; SMITH, J. S.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellite. **Genetics**, Austin, v. 165, n. 4, p.2117-2128, 2003.

LORENCETTI, C.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; VALÉRIO, I. P.; BENIN, G.; ZIMMER, P. D.; VIEIRA, E. A. Distância genética e sua associação com heterose e desempenho de híbridos em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 34, p.591-598, 2006.

MELO, W. M. C.; PINHO, R. G. V.; FERREIRA, D. F. Capacidade combinatória e divergência genética em híbridos comerciais de milho. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 25, n. 4, p.821-830, 2001.

MILLER, M. **TTPGA – Tools for population genetic analysis**: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Version 1.3, 1997.

Cultura Agronômica, Ilha Solteira, v.24, n.1, p.1-16, 2015

Disponível em: < <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/TFPGADOC.PDF>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MIRANDA FILHO, J. B.; VENCOSKY, R. The partial circulant diallel cross at interpopulation level. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 2, p.249-255, 1999.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M.; CHARU, S.; SINGH, N. N. A. Microsatellite marker based study of chromosomal regions and gene effects on yield and yield components in maize. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 7, n. 2A, p.599-606, 2002.

OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R. L.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p.395-398, 2000.

PAIVA, W. O. Divergência genética entre linhagens de melão e a heterose de seus híbridos. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p.34-37, 2002.

PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; GUIMARÃES, O. S.; LÜDERS, R. R.; GALLO, P. B.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M. Capacidade combinatória, divergência genética entre linhagens de milho e correlação com heterose. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 3, p.639-648, 2008.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Isoenzimas e microssatélites em plantas. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 4, n. 20, p.16-19, 2001.

PINTO, L. R.; VIEIRA, M. L. C.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; SOUZA, A. P. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. **Euphytica**, Wageningen, v. 134, n. 3, p.277-286, 2003.

ROGERS JÚNIOR, J. S. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: **STUDIES IN GENETICS**, 7., 1972, Austin. **Proceedings of the...** Austin: University of Texas, 1972. p. 145-153.

SIBOV, S. T.; SOUZA JÚNIOR, C. L.; GARCIA, A. A. F.; SILVA, A. R.; GARCIA, A. F.; MANGOLIN, C. A.; BENCHIMOL, L. L.; SOUZA, A. P. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 2. Quantitative trait loci (QTL) for grain yield, plant height, ear height and grain moisture. **Hereditas**, Lund, v. 139, n. 2, p.107-115, 2003.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, L. A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of American Society of Agronomy**, Madison, v. 34, n. 10, p.923-32,

Cultura Agrônômica, Ilha Solteira, v.24, n.1, p.1-16, 2015

1942.

SU-XIA, X.; LIU, J.; LIU, G. S. The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize. **Hereditas**, Lund, v. 141, n. 3, p.207-215, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p.1596-1599, 2007.

VAZ PATTO, M. C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 137, p.63-72, 2004.

WAGNER, A. P.; CREEL, S.; KALINOWSKI, S. T. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. **Heredity**, London, v. 97, n. 5, p.336-345, 2006.

