

## SELEÇÃO DE FAMILIAS DE IRMÃOS COMPLETOS DE MILHO COMUM (*Zea mays* L.) ASSISTIDA POR MARCADORES SSR

Júlio Cesar Fiorio Vettorazzi<sup>1</sup>, Keila Silva da Cunha<sup>2</sup>, Roberto dos Santos Trindade<sup>3</sup>, Pedro Henrique Araújo Diniz Santos<sup>4</sup>, Geovana Cremonini Entringer<sup>5</sup>, Renato Santa Catarina<sup>6</sup>, Messias Gonzaga Pereira<sup>7</sup>.

<sup>1,6</sup>Graduando no curso de Agronomia- UENF, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, [juliocesar.f.v@hotmail.com](mailto:juliocesar.f.v@hotmail.com) [Renato.scat@gmail.com](mailto:Renato.scat@gmail.com).

<sup>2,4,5</sup>Pós Graduando em Genética e Melhoramento de Plantas – UENF, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, [kscuenf@yahoo.com.br](mailto:kscuenf@yahoo.com.br) [phsantos2004@yahoo.com.br](mailto:phsantos2004@yahoo.com.br) [Geocremonini@yahoo.com.br](mailto:Geocremonini@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Pesquisador do INCAPER- CRDR Centro – Norte, [roberto.trindade@incaper.es.gov.br](mailto:roberto.trindade@incaper.es.gov.br)

<sup>7</sup> Professor Titular do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas – UENF, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, [messias@uenf.br](mailto:messias@uenf.br)

**RESUMO** - Dentre as metodologias para o melhoramento da cultura, a Seleção Recorrente Recíproca (SRR) visa aumentar gradativamente a frequência de alelos favoráveis por meio de repetidos ciclos de seleção, mantendo ou mesmo ampliando a variabilidade genética da população. Este trabalho visa apresentar as etapas de geração e seleção de famílias de irmãos completos de milho comum, buscando a obtenção de novos híbridos e variedades com alto desempenho agrônomo e adaptados a região Norte e Noroeste Fluminense, por meio da seleção recorrente recíproca assistida por marcadores moleculares. No 12º ciclo, para a etapa de recombinação, foram selecionados, com base em atributos morfoagronômicos, 40 genótipos das populações CIMMYT (Grão tipo FLINT) e Piranão (Grão Tipo DENT), em blocos distintos, correspondentes às 40 progênes superiores de irmãos completos. Os 40 genótipos de cada população foram submetidos à análise da diversidade via marcadores SSR, sendo efetuada uma nova seleção dos 25 genótipos mais divergentes em cada população, para compor as populações melhoradas do 13º ciclo, sendo eliminados os demais genótipos antes do início da etapa de recombinação. Os marcadores SSR foram efetivos em agrupar os genótipos em seus respectivos grupos heteróticos. Os parâmetros genéticos obtidos indicam tanto manutenção da variabilidade genética na população em questão, bem como expectativas de aumentos nos ganhos por seleção em virtude da mesma ser praticada com base no fenótipo e no genótipo das progênes. Os indivíduos selecionados permitirão não somente dar sequência aos ciclos seguintes, como também, incrementar a heterose nos procedimentos de hibridação.

Palavras-chave: parâmetros genéticos, seleção recorrente, marcadores moleculares.

### Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho (*Zea mays* L.), sendo este o principal cereal cultivado no Brasil (FAO, 2010). É um alimento rico em proteínas e carboidratos, sendo utilizado em todo o país para a alimentação humana e animal, e na indústria.

A despeito da região Norte/Noroeste Fluminense não apresentar tradição na produção de milho, com apenas 7.000 ha plantados e produtividade de 2,5 kg.ha<sup>-1</sup> (AGRIANUAL, 2010), as características edafoclimáticas da região, com relevo de plano a pouco ondulado,

permitindo plena mecanização, e seu clima caracterizado por um verão chuvoso e inverno seco, possibilitam um bom desenvolvimento da cultura. Em adição a este fato, além da necessidade do milho para grãos, a cultura é também utilizada na produção de silagem para o gado na região (CONAB, 2010).

Neste contexto, torna-se necessária o desenvolvimento de cultivares que possam atender as demandas dos agricultores da região, promovendo o avanço da economia da região e o aumento da renda do homem do campo. Para tanto, o melhoramento genético vegetal é uma ferramenta indispensável, uma vez que permite a recombinação de genes entre genótipos superiores, possibilitando a obtenção de cultivares de alta produtividade e adaptados a condições ambientais diversas (Allard, 1971).

Desde o ano de 1996, a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) vem conduzindo um programa de melhoramento genético de milho baseado na metodologia da seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos (SRRFIC) assistido por marcadores moleculares (Tardin et al., 2007; Gabriel, 2006;2009). Este programa já favoreceu a região Norte/Noroeste Fluminense com duas cultivares de milho híbrido interpopulacional, o ‘UENF 506-6’ e o ‘UENF 506-8’, as quais expressam excelente comportamento agrônomo. Neste momento este programa de seleção recorrente se encontra em seu 13º ciclo, sendo que ambas as populações em melhoramento ainda apresentam potencial genético para ganhos por seleção (Gabriel, 2009).

Este trabalho tem por objetivo apresentar as etapas de geração e seleção de famílias de irmãos completos de milho comum para o 13º ciclo de SRRFIC, visando a obtenção de novos híbridos e variedades com alto desempenho agrônomo e adaptados a região a Norte e Noroeste Fluminense.

### **Material e Métodos**

Neste programa de melhoramento interpopulacional, são utilizadas duas populações, pertencentes a grupos heteróticos distintos: CIMMYT e Piranão. Na Seleção Recorrente Recíproca, cada ciclo envolve três etapas básicas:

- 1) Geração de progênies de irmãos completos: as populações são plantadas em fileiras alternadas para facilitar os cruzamentos de maneira a permitir a obtenção de aproximadamente 200 famílias de Irmãos Completos. Todas as famílias  $S_1$  são obtidas e armazenadas, e aquelas correspondentes às famílias superiores são então recombinadas. Este plantio ocorre no Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo, em Campos dos Goytacazes – RJ.

2) Avaliação das famílias para a identificação das superiores: as famílias de irmãos completos são avaliadas em delineamento em blocos ao acaso, em dois ambientes (Campos dos Goytacazes - Colégio Estadual Agrícola Antônio Sarlo - e Itaocara - Estação Experimental da PESAGRO-RIO), com duas repetições. Dado o grande número de tratamentos (200 famílias), os mesmos são agrupadas em "sets", sendo que cada "set" contém 20 famílias e 4 testemunhas, totalizando 10 "sets".

3) Recombinação das sementes remanescentes correspondentes às famílias superiores para a obtenção das populações do próximo ciclo, sendo selecionadas 40 famílias de superiores em cada população, para formação de lotes independentes de recombinação. Nesta etapa, a seleção das melhores famílias é feita por aplicação de índices de seleção.

Após o cumprimento destas etapas, para a análise da diversidade via marcadores de DNA, parte das sementes  $S_1$  dos 40 genótipos armazenadas da primeira etapa da seleção recorrente, para cada população foi semeada em vasos de 5 litros, mantidos em casa de vegetação pertencente à Unidade de Apoio à Pesquisa da UENF. Aproximadamente quinze dias após a emergência das plântulas, em cada vaso, a parte aérea de 10 plântulas foi coletada, em "Bulk", para a extração do DNA. Este material foi envolvido por papel alumínio, devidamente identificado, acondicionado em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e levado para o ultrafreezer a  $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, cada amostra coletada foi macerada separadamente com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, do qual uma alíquota de aproximadamente 0,1 g foi transferida para um tubo *eppendorf*. Esta amostra foi utilizada para extração de DNA por uso de kit RBC<sup>®</sup>, conforme as instruções do fabricante, sendo o DNA padronizado para uma concentração de  $5\text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  por leitura em quantificador NanoDrop<sup>®</sup>.

As reações de amplificação de DNA foram realizadas em um volume final de 30  $\mu\text{L}$ , contendo 50 ng de DNA, 6  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 5X,  $\text{MgCl}_2$  (1,5mM), DNTPs (200  $\mu\text{M}$  de cada), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (Sigma, USA) e 0,75 U de Taq DNA polimerase (Go Taq Flexi, Promega, USA). Foram selecionados 20 primers para este trabalho. As amplificações foram realizadas se utilizando a técnica de "touchdown", em termociclador Eppendorf, em que a temperatura de pareamento dos primers teve início com  $5^{\circ}\text{C}$  acima da temperatura ótima e sofreu um decréscimo de  $1^{\circ}\text{C}$  durante os cinco primeiros ciclos de amplificação até alcançar a temperatura desejada. O programa utilizado foi de  $94^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos;  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto;  $Y^{\circ}\text{C}$  com redução de  $1^{\circ}\text{C}$  a cada ciclo por 1 minuto;  $72^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos (durante os cinco primeiros ciclos);  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto;  $Y^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto;  $72^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos (durante

30 ciclos); 72°C por 7 minutos, onde: Y= Temperatura específica de anelamento para cada primer.

Depois da amplificação, o material foi distribuído em placas específicas contendo 96 poços, para eletroforese capilar no aparelho AdvanCETM FS96, junto com outra placa contendo marcador de 10 e 500 pares de base. Foi utilizado também utilizado o marcador DNA Ladder (Invitrogen, USA) de 250pb durante as corridas para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados. O DNA contido nas placas foi transportado para os capilares onde foram submetidos à uma corrida de 140 minutos à uma corrente de 7,50 Kw.

Os dados obtidos a partir da amplificação dos iniciadores SSR foram convertidos em código de números para cada alelo por loco. Tal matriz numérica foi desenvolvida como descrito a seguir: um loco que apresenta três alelos, tera a representação 11, 22 e 33 para as formas homozigotas ( $A_1A_1$ ,  $A_2A_2$  e  $A_3A_3$ ) e 12, 13 e 23 para as heterozigotas ( $A_1A_2$ ,  $A_1A_3$  e  $A_2A_3$ ). A partir dessa matriz numérica foi calculada a distância genética entre os genótipos estudados, com o auxílio do programa GENES (Cruz, 2004) utilizando o Índice ponderado proposto por Ramos et al. (2010). A partir da matriz numérica, obteve-se a distância genética pelo complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizado para agrupar os genótipos pelo método PCoA com auxílio do programa Mega 5 (Kumar et al., 2009).

### **Resultados e Discussão**

Os resultados das estimativas dos parâmetros genéticos indicam que as famílias de irmãos completos dispõem de variabilidade genética para as características, sendo promissores para os próximos ciclos (Tabela 1). Parâmetros genéticos são importantes para identificar a natureza da ação dos genes envolvidos no controle das características de interesse, uma vez que avaliam a eficiência de diferentes estratégias de melhoramento, por meio da quantificação da variabilidade genética, a qual é essencial para obtenção de ganhos por seleção (Cruz e Carneiro, 2006).

Nota-se que, a despeito da característica empalhamento (Emp), os demais caracteres apresentaram herdabilidade ( $h^2$ ) mediana entre 48,33 e 70,45% (Tabela 1). Para a produção (Prod), obteve-se  $h^2$  de 48,33%, denotando possibilidade de seleção de genótipos superiores. Os valores das estimativas dos índices de variação foram satisfatórios para todas as características, variando entre 24,40 e 77,15. Tal parâmetro contribui para indicar a presença de variabilidade genética suficiente na população em estudo, contribuindo para a tomada de decisão quanto ao método de melhoramento a ser utilizado. Com relação aos coeficientes de variação experimentais (CV%), observa-se que, com exceção do Emp, as demais

características apresentam CV (%) baixo, enquanto que, para produção e peso de grãos, um CV(%) médio (23,01%), o que indica bom controle experimental.

Estimou-se a distância genética entre os 40 genótipos superiores de cada população analisados via marcadores SSR, pelo complemento aritmético do índice de Jaccard. Com base neste estudo, os 40 indivíduos foram agrupados pelo método das coordenadas principais PcoA (Figura 1). Na eliminação dos genótipos para a composição do lote de recombinação, adotaram-se os seguintes critérios para descarte: eliminação dos genótipos próximos a outra população; eliminação dos genótipos contaminantes, ou seja, agrupados com indivíduos pertencentes à outra população; e a eliminação de genótipos geneticamente próximos, se mantendo aqueles cujas médias de produção de grãos foram superiores.

Na etapa de recombinação, no total foram cultivados 40 genótipos de cada população em blocos diferentes. De posse das análises via marcador molecular, dos 40 genótipos de cada uma das populações, CIMMYT e Piranão, quinze indivíduos foram eliminados para cada uma, permanecendo 50 genótipos para compor as populações melhoradas do 13º ciclo. Esta seleção teve como objetivo maximizar a variabilidade genética dessas populações, bem como manter e até mesmo ampliar a distância genética entre elas.

O ranqueamento das médias das 25 melhores progênes obtidas no 13º ciclo de seleção recorrente bem como as testemunhas utilizadas no mesmo ensaio de competição (Tabela 2), demonstra a eficiência do método para o melhoramento de ambas as populações e também para a formação de seus híbridos, e que, ainda os híbridos obtidos pelo programa apresentam médias de produtividade bem próximas ou até superiores as testemunhas.

### Literatura Citada

- ALLARD, R.W. (1971) Princípios do melhoramento genético de plantas. São Paulo: Edgard Blücher, 381 p.
- AGRIANUAL (2010) São Paulo: FNP consultoria e comércio LTDA, 385-406p.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2010). Boletim informativo.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. (2004) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.1, 3 ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 480p.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. (2006) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. v.2, ed.2, Viçosa, MG: Editora UFV, 144p.
- GABRIEL, A.P.C. (2006) Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho (*Zea mays* L.) assistida por marcadores moleculares. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Campos dos Goytacazes – UENF - RJ, 112p.
- GABRIEL, A.P.C. (2009) Seleção recorrente recíproca em famílias de irmãos completos em milho comum (*Zea mays* L.) monitorada por marcadores moleculares: avanço de gerações e avaliação do progresso genético. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Campos dos Goytacazes – UENF - RJ, 103p.

KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. (2009) MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 9: 299-306.

RAMOS, H.C.C.; PEREIRA, M.G.; GONÇALVES, L.A.G.; PINTO, F.O.; SILVA, F.F.; AMARAL JÚNIOR, A.T. (2011) Comparison of multiallelic distances on the genetic diversity quantification in papaya. *Acta Scientiarum*, 33: 59-66.

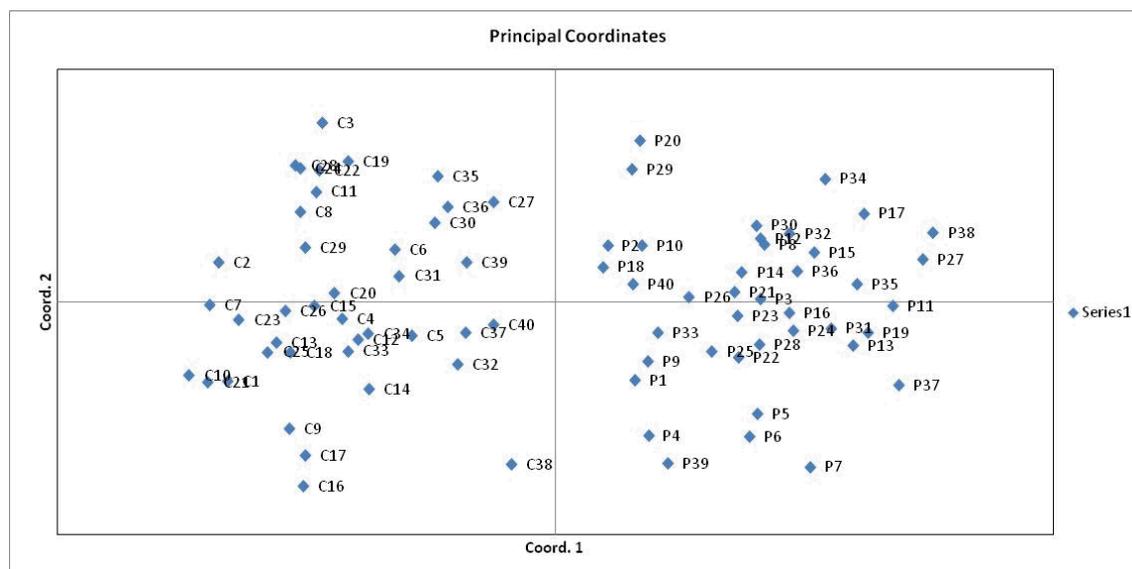
TARDIN, F.D.; PEREIRA, M.G.; GABRIEL, A.P.C.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; SOUZA FILHO, G.A. (2007) Selection index and molecular markers in reciprocal recurrent selection in maize. *Crop Breeding and Applied Biotchnology*, 7:225-233.

**Tabela 1-** Estimativas das variâncias genotípicas ( $\sigma_g^2$ ), fenotípica ( $\sigma_f^2$ ), coeficientes de variação genética CVg(%), índice de variação  $I_v(\%)$ , coeficiente de herdabilidade ( $h^2$ ), as médias de cada característica e o coeficiente de variação ambiental (CVe%).

Características <sup>1/</sup>	Parâmetros genéticos						
	$\sigma_g^2$	$\sigma_f^2$	CVg (%)	$I_v(\%)$	$h^2$	Média	CVe (%)
Prod	421115,0	870522,5	11,13	48,39	48,33	5828	23,01
Npl	1,952005	3,92479	6,07	49,63	49,74	23	12,24
Emp	0,03832	0,19619	47,75	24,40	19,54	0,41	195,74
Nes	17,2856	24,5364	12,23	77,15	70,45	34	15,85
Pes	153334,3	289577,2	10,78	53,03	52,95	3632	20,33
Pgr	105278,8	217630,6	8,93	38,82	48,37	2914	23,01
P100	3,35895	6,76887	6,32	48,95	49,62	29	12,91

<sup>1/</sup> Prod = produção (pkha); Npl = número de plantas; Emp = empalhamento; Nes = número de espigas; Pes = peso de espiga (g); Pgr = peso de grãos (g) e P100 = peso de 100 grãos (g).

<sup>ns</sup> = não significativo; \*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; \* Significativo a 5% de F, respectivamente.



**Figura 1** – Diagrama de dispersão entre as populações CIMMYT e Piraná obtidos pelo método das coordenadas principais.

**Tabela 2** – Ranqueamento das médias dos 25 genótipos superiores e testemunhas avaliados em ensaio de competição em Campos e Itaocara, RJ (2010/2011)

Genótipo	Média (Kg/ha)	Genótipo	Média (Kg/ha)
182	8200	184	7150
166	7550	111	6950
150	7500	127	6900
155	7450	16	6900
118	7400	171	6900
72	7400	14	6850
74	7400	183	6850
52	7400	44	6850
147	7300	135	6850
131	7300	148	6850
17	7300	T4 (C12 X P12)	6214
167	7250	T3 (C11 X P11)	6114
43	7250	T2 (C10 X P10)	5421
78	7250	T1 (C8 X P8)	5343
91	7200	T5 (BR 106)	5017

Média dos 25 genótipos superiores: 7.208 kg/ha