

Associação de marcadores moleculares com o caráter peso de panícula em aveia

Volmir Sergio Marchioro¹ e Fernando Irajá Félix de Carvalho²

¹Engenheiro Agrônomo, Dr, Pesquisador do Programa de Melhoramento de Trigo da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC), BR 467, km 98, C.P. 301, CEP 85813-450, Cascavel, PR, Brasil.

²Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, FPeL, Campus Universitário C.P. 354, CEP 96001-970, Pelotas, RS.

volmir@marchioro.eng.br, carvalho@ufpel.tche.br

Resumo: Os programas de melhoramento genético de plantas estão constantemente desenvolvendo novas técnicas objetivando aperfeiçoar as convencionalmente utilizadas, desta forma, o recente interesse em avanços tecnológicos como o uso de marcadores moleculares. A seleção com base no fenótipo pode ser influenciada por fatores de ambiente, sendo necessário que o melhorista utilize métodos de seleção que separem efeitos genéticos dos de ambiente. O objetivo deste estudo foi identificar a associação de marcadores moleculares com região e/ou regiões cromossômicas responsáveis pelo caráter peso de panícula em aveia. Uma população segregantes de aveia, obtida do cruzamento entre dois genitores divergentes para o caráter peso de panícula, foi submetida à seleção para o caráter peso de panícula, sob três diferentes métodos de semeadura (em cova, em planta espaçada e em linha cheia), no ano de 2000. Depois de trilhadas as panículas, os grãos foram agrupados em *bulk*, com as panículas mais pesadas e com menos pesadas, dentro de cada método de semeadura. Em 2001 as sementes de cada um dos tratamentos e mais os genitores, foram semeadas em copos plásticos. Por ocasião da formação da segunda folha foram tiradas amostras para extração de DNA e submetidas a análise por marcadores moleculares através da técnica de AFLP. A técnica de marcadores moleculares AFLP pode ser uma excelente ferramenta na identificação de associações entre caracteres quantitativos como rendimento de grãos e peso de panícula.

Palavras-chave: *Avena sativa* L., seleção, peso de panícula.

Association of molecular markers with panicle weight in oats

Abstract: The programs of genetic improvement of plants are constantly developing new techniques aimed to improve the conventionally used in this way, the recent interest in technological advances such as the use of molecular markers. Phenotype-based selection can be influenced by environmental factors, being necessary for the breeder to use selection methods separating genetic and environmental effects. The goal of this study was identify the association of molecular markers with the chromosome region(s) responsible for the character panicle weight. A population segregating oat from the cross between two divergent parents for panicle weight was under selection for panicle weight under three different sowing methods (hill, spaced plant and full line), in 2000. After threshed panicles, grains were grouped in *bulk* with heavier panicles with less and weighed in each method of sowing. In 2001 the seeds of each treatment and the more parents were sown in plastic cups. During the formation of the second leaf samples were taken for DNA extraction and subjected to analysis by molecular markers by AFLP technique. The technique of AFLP markers can be an excellent tool for identifying associations between quantitative traits like yield and panicle weight.

Introdução

A aveia tem como centro de origem a Ásia e o Oriente Médio e foi introduzida no Brasil pelos descobridores e imigrantes europeus, e só recentemente passou a ter importância econômica. De acordo com Floss (1989), a cultura da aveia vem revelando destaque na região Sul do País, aumentando progressivamente a sua área de cultivo devido a uma maior demanda interna deste cereal.

Carvalho (1987) relatou que o sucesso da aveia está intimamente associado com o ajuste de novas constituições genéticas às condições de ambiente e à estabilidade do rendimento de grãos diante das variações dos sistemas de cultivo. Segundo Sampson (1971), o peso da panícula em aveia tem grande potencial para a ser usado como critério para a seleção indireta de genótipos superiores para rendimento de grãos em gerações segregantes.

A utilização de marcadores moleculares na quantificação da divergência genética vem crescendo nos últimos anos, uma vez que se constituem em excelente ferramenta para a obtenção de informações genéticas contidas no genoma de um organismo (VIEIRA et al., 2005). Os programas de melhoramento genético de plantas estão constantemente desenvolvendo novas técnicas objetivando aperfeiçoar as convencionalmente utilizadas, por isso o recente interesse em avanços tecnológicos como o uso de marcadores moleculares. Através da técnica de marcadores moleculares é possível acessar com segurança o genótipo do indivíduo ao invés de apenas o fenótipo. Sendo possível avaliar a variabilidade genética existente dentro e entre espécies distintas e a utilização desta em programas de melhoramento.

Portanto, com o emprego destas técnicas, juntamente com os conhecimentos da genética quantitativa e de condução de populações segregantes, é possível a seleção de novas constituições genéticas com grande segurança. Como consequência, a seleção de genitores superiores em programas de melhoramento genético poderá ser realizada de forma objetiva e precisa, determinando a formação de populações segregantes com alta frequência de indivíduos superiores.

Os distintos tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis se diferenciam pela técnica utilizada para revelar variabilidade em nível de ácido desoxirribonucleico (DNA). A técnica de marcadores moleculares *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), está sendo bastante utilizada, a qual alia a especificidade dos sítios de restrição do *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) à praticidade da amplificação do *Polymerase Chain Reaction* (PCR), apresentando-se como uma poderosa ferramenta na caracterização de genomas e no mapeamento genético (VOS et al., 1995). Uma das vantagens do AFLP é o

grande poder de detecção de variabilidade genética, uma vez que a técnica explora polimorfismos de restrição e de amplificação. O AFLP alia a vantagem de explorar regiões genômicas arbitrárias, sem a necessidade do conhecimento prévio das seqüências do DNA, com a elevada especificidade da técnica de PCR. Associado a isto a análise por blocos segregantes, *Bulk Segregant Analysis* (BSA), proposta por Michelmore et al. (1991), pode ser útil, principalmente para a identificação de regiões do genoma ainda não cobertas.

A maioria dos caracteres de importância econômica está sob controle genético complexo, envolvendo a ação de vários genes, o que torna difícil sua manipulação e compreensão. Regiões genômicas contendo locos gênicos associados a tais caracteres quantitativos são denominados de *Quantitative Trait Loci* (QTL). A habilidade de ocorrer detecção de QTLs por meio de marcadores moleculares é função da magnitude do efeito do QTL e do tamanho da população em estudo.

Neste sentido, este trabalho teve por objetivo verificar associação de marcadores moleculares com região e/ou regiões genômicas responsáveis pela expressão do caráter peso de panícula em aveia através da técnica de análise molecular AFLP.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no campo experimental do Centro de Genômica e Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - UFPel, no município de Capão do Leão, no ano agrícola de 2000. Oito populações segregantes de aveia na geração F₃ foram inseridas no experimento. Estas populações foram conduzidas em três diferentes métodos de semeadura: em planta espaçada, em linha cheia e em cova, este último descrito como método *Hill*, por Frey (1965), que consiste na semeadura em covas, com um número determinado de sementes por cova. O delineamento utilizado no experimento foi o de blocos casualizados, com duas repetições. No método de semeadura em cova, as parcelas foram compostas de dez covas com 15 sementes por cova, espaçadas em 45 cm entre covas. No método de semeadura em planta espaçada as parcelas foram compostas de dez linhas de 2 m de comprimento espaçadas em 20 cm entre linhas e entre plantas e no método de semeadura em linha cheia as parcelas foram compostas de duas linhas de 2 m de comprimento com 60 sementes aptas por metro linear.

Após a maturação, foram colhidas todas as panículas, nos três métodos de semeadura das oito populações segregantes, selecionando para este estudo apenas a população UFRGS

14 x OR 2 oriunda de genitores contrastantes para o caráter peso de panícula, sendo a UFRGS 14 e OR 2 com alto e baixo peso de panícula, respectivamente. As panículas desta população foram pesadas e as com peso superior à média mais um desvio padrão, assim como as com peso inferior à média menos um desvio padrão, dentro de cada cova, dentro de cada linha de planta espaçada e dentro de cada linha cheia foram selecionadas.

Depois de trilhadas as panículas selecionadas, os grãos foram agrupados em *bulk*, formando pares com as panículas mais pesadas e outro com as menos pesadas dentro de cada cova, dentro de cada linha de planta espaçada e dentro de cada linha cheia, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de *bulks* formados com a seleção para o peso de panícula da população UFRGS 14 x OR 2 nos três métodos de semeadura e mais os genitores, UFPel/Pelotas, 2000/2001

Tratamento	Tratamento	Tratamento
1 Sel. cova - superior	17 Sel. cova - superior	33 Sel. planta espaçada - superior
2 Sel. cova - inferior	18 Sel. cova - inferior	34 Sel. planta espaçada - inferior
3 Sel. cova - superior	19 Sel. cova - superior	35 Sel. planta espaçada - superior
4 Sel. cova - inferior	20 Sel. cova - inferior	36 Sel. planta espaçada - inferior
5 Sel. cova - superior	21 Sel. planta espaçada - superior	37 Sel. planta espaçada - superior
6 Sel. cova - inferior	22 Sel. planta espaçada - inferior	38 Sel. planta espaçada - inferior
7 Sel. cova - superior	23 Sel. planta espaçada - superior	39 Sel. planta espaçada - superior
8 Sel. cova - inferior	24 Sel. planta espaçada - inferior	40 Sel. planta espaçada - inferior
9 Sel. cova - superior	25 Sel. planta espaçada - superior	41 Sel. linha cheia - superior
10 Sel. cova - inferior	26 Sel. planta espaçada - inferior	42 Sel. linha cheia - inferior
11 Sel. cova - superior	27 Sel. planta espaçada - superior	43 Sel. linha cheia - superior
12 Sel. cova - inferior	28 Sel. planta espaçada - inferior	44 Sel. linha cheia - inferior
13 Sel. cova - superior	29 Sel. planta espaçada - superior	45 Genitor - UFRGS 14
14 Sel. cova - inferior	30 Sel. planta espaçada - inferior	46 Genitor - OR 2
15 Sel. cova - superior	31 Sel. planta espaçada - superior	
16 Sel. cova - inferior	32 Sel. planta espaçada - inferior	

Em 2001 as sementes de cada um dos 46 tratamentos (44 *bulks* e mais os genitores), foram semeadas em três copos plásticos com dez sementes por copo. Por ocasião da formação da segunda folha uma pequena amostra de folha de seis plantas, de cada um dos três copos de cada tratamento foi coletada. Estas pequenas amostras foram agrupadas formando uma amostra maior de 18 plantas. No Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento do Setor de Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel - UFPel, estas amostras foram submetidas à extração de DNA, utilizando o método descrito por Doyle & Doyle (1987).

Para o estudo molecular foi utilizada a técnica de análise molecular denominada de AFLP. Depois de um *screening* visando à seleção de pares de *primers* com capacidade de gerar polimorfismos entre os genitores (UFRGS 14 e OR 2), foram selecionados os pares de *primers* listados na Tabela 2.

Os resultados obtidos foram submetidos à construção de uma matriz de dissimilaridade entre os tratamentos avaliados neste estudo, com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard (DIAS, 1998), codificando a presença da banda no gel como “1” e a sua ausência como “0”. O coeficiente de Jaccard entre pares de genótipos é dado por $S_{ij} = a/a + b + c$, onde “a” é o número de locos comuns aos genótipos *i* e *j*, enquanto que “b” e “c” são os números de locos presentes apenas em cada um dos genótipos. A partir da matriz de dissimilaridade foi obtido o dendrograma pela técnica do vizinho mais próximo, que consiste em identificar na matriz de dissimilaridade os genótipos mais similares, formando um grupo inicial e, a partir deste grupo, foram estimadas as distâncias em relação aos demais genótipos. Estas análises foram realizadas utilizando o programa computacional Genes, desenvolvido por Cruz, 2001.

Tabela 2. *Primers* de AFLP utilizados no estudo das populações submetidas a três diferentes métodos de condução durante o processo de seleção, UFPel/Pelotas, 2000/2001

Corte da enzima de restrição <i>MseI</i>		Corte da enzima de restrição <i>EcoRI</i>	
<i>Primer</i>	Bases seletivas	<i>Primer</i>	Bases seletivas
M1	CAA	E1	AAC
M2	CTA	E2	AAG
M3	CTG	E3	ACC
M4	CTC	E4	ACT
M5	CAC	E5	ACA

Resultados e Discussão

No estudo da população UFRGS 14 x OR 2 foi obtido um total de 99 bandas, para os cinco pares de *primers* testados. O maior número de bandas encontradas em uma única análise foi verificado para o par de *primers* M-CAA/E-AAC, com 24 bandas e o menor número para o par de *primers* M-CTC/E-ACT, com apenas 14 bandas. Os pares de *primers* M-CTA/E-AAG, M-CTG/E-ACC e M-CAC/E-ACA revelaram 21, 20 e 20 bandas,

respectivamente. A percentagem de bandas polimórficas entre *bulks* oriundos da seleção para alto e para baixo peso de panícula, nos três métodos de semeadura em cova, planta espaçada e linha cheia foi em média 9%. Esta mesma percentagem de bandas polimórficas (9%), se verificou entre os genitores da população em estudo, UFRGS 14 e OR 2.

Na Figura 1 é apresentada a frequência de bandas polimórficas entre os *bulks* formados com a seleção das panículas mais pesadas contra a seleção das panículas mais leves, nos três métodos de semeadura. Foi observada para os cinco pares de *primers* testados, uma maior frequência de bandas polimórficas entre os *bulks* oriundos da seleção no método de semeadura em cova, quando comparados com os métodos de semeadura em planta espaçada e linha cheia. Este fato evidencia a hipótese de que a participação do ambiente na expressão do fenótipo durante o processo de seleção, provavelmente tenha ocorrido de forma muito reduzida ou com mesma intensidade para todas as plantas de uma mesma cova. Na literatura vários autores comentam que a seleção indireta de linhas superiores em gerações segregantes pode ser eficiente desde que as plantas sejam conduzidas a campo e sob espaçamento reduzido, como relatado por Sampson (1971) em aveia, McNeal et al. (1978) em trigo, Valentine (1983) em cevada e Gravois & McNew (1993) em arroz.

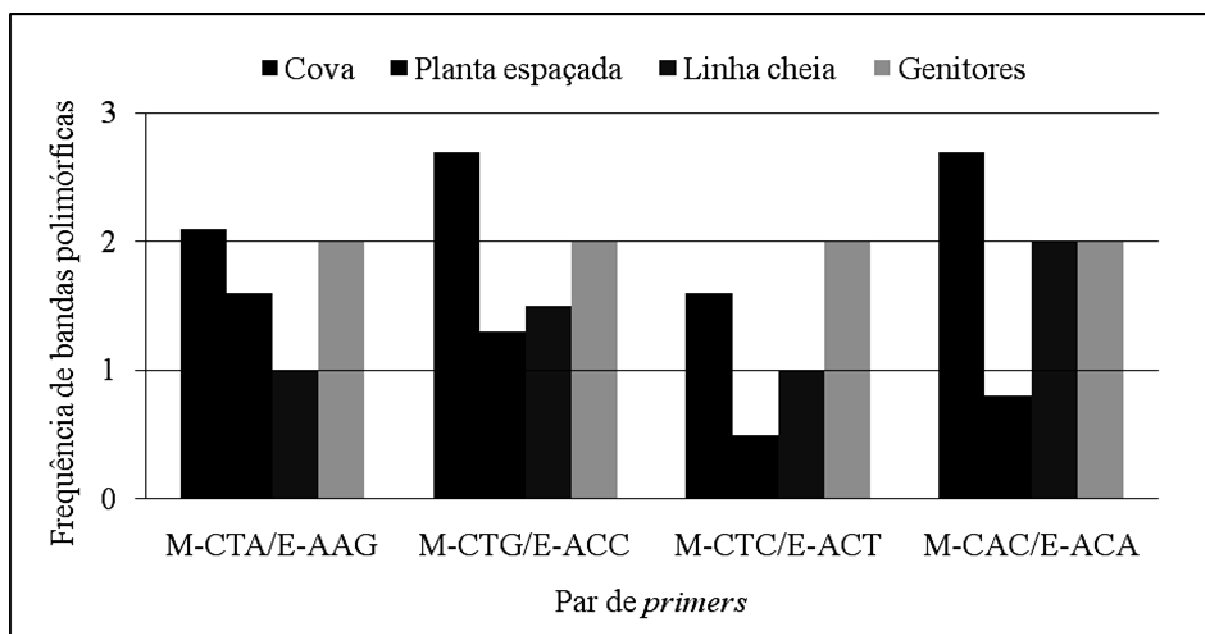


Figura 1. Frequência de bandas polimórficas para cada par de *primers*, na comparação dos *bulks* oriundos da seleção das panículas mais pesadas com os oriundos das panículas menos pesadas, nos três métodos de semeadura e entre os genitores, através da técnica de AFLP, UFPel/Pelotas, 2000/2001.

Ainda na Figura 1 se verifica que a frequência de bandas polimórficas entre os genitores UFRGS 14 (alto peso de panícula) e OR 2 (baixo peso de panícula) foi de duas bandas polimórficas para cada par de *primers* testado. Este fato permite formar a hipótese de que existe dissimilaridade genética entre os genitores utilizados na obtenção da população em estudo, dissimilaridade esta, que pode estar associada ao caráter peso de panícula.

A partir da matriz de dissimilaridade obtida com base no coeficiente de similaridade de Jaccard (Dias, 1998), foi desenvolvido através da técnica do vizinho mais próximo o dendrograma exposto na Figura 2, onde se observa que de maneira geral, os tratamentos provenientes da seleção para alto peso de panícula, nos três métodos de semeadura da população segregante em estudo, expressaram um posicionamento próximo uns dos outros, ocupando a parte superior do dendrograma, juntamente com o genitor UFRGS 14, que possui alto peso de panícula. Por outro lado, os tratamentos oriundos da seleção para baixo peso de panícula, nos três métodos de semeadura, ocuparam a parte inferior do gráfico, juntamente com o genitor OR 2 de reduzido peso de panícula.

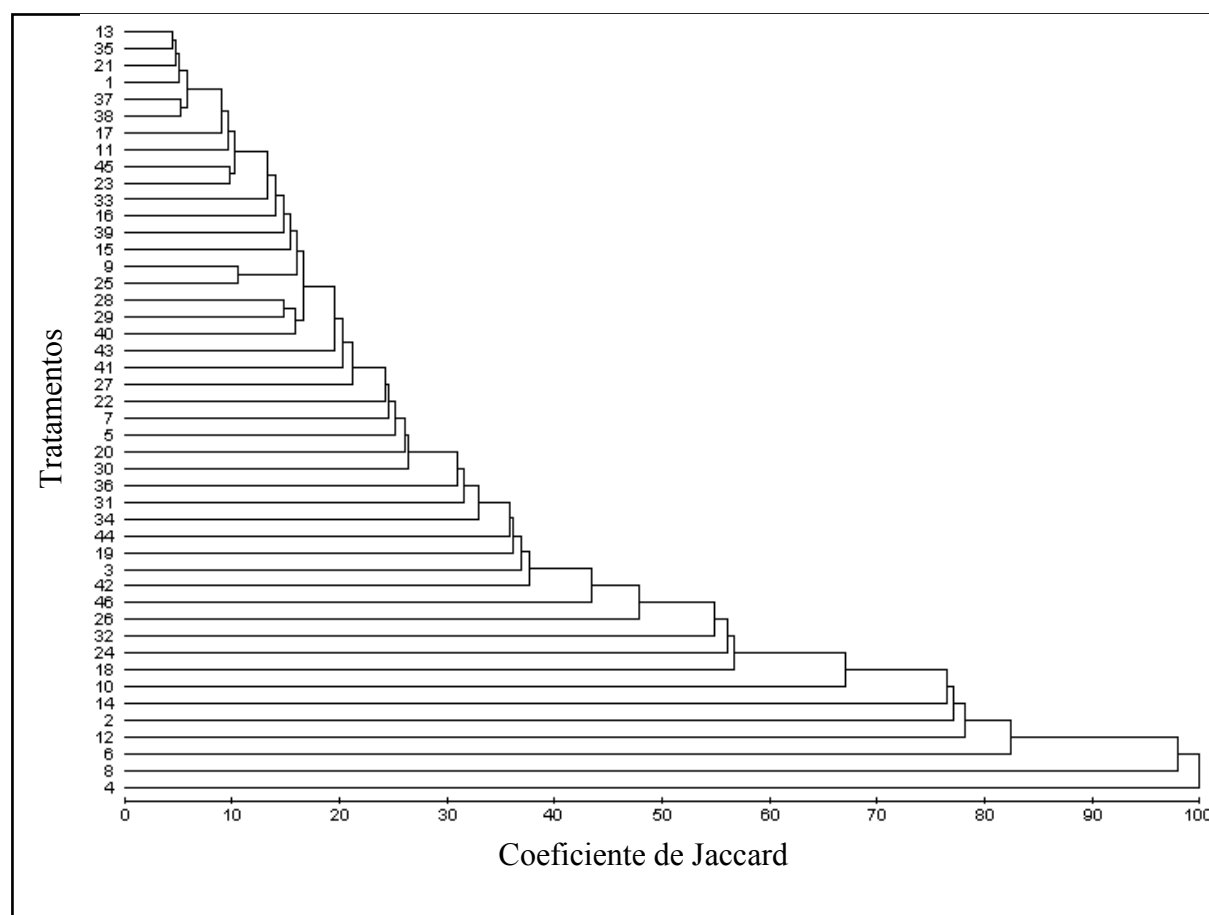


Figura 2. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os tratamentos, obtida pela técnica do vizinho mais próximo, utilizando a matriz de dissimilaridade obtida através do coeficiente de Jaccard, UFPel/Pelotas, 2000/2001

Estes resultados permitem formular a hipótese de que o polimorfismo verificado neste estudo, quando da comparação de *bulks* oriundos da seleção de panículas de alto peso, contra *bulks* oriundos da seleção de panículas de baixo peso tem grande possibilidade de estar associado a regiões do genoma responsáveis pela expressão do caráter peso de panícula em aveia. Embora seja necessário o desenvolvimento de uma série de trabalhos visando o mapeamento destas regiões, a possibilidade de se aplicar à seleção assistida para o caráter peso de panícula em programas de melhoramento genético de aveia é extremamente importante, devido à alta correlação do caráter em questão com o rendimento de grãos.

Conclusão

O grau de polimorfismo encontrado entre os *bulks* provenientes da seleção para alto e baixo peso de panícula neste estudo, revela marcadores candidatos e permite testar a associação destes com regiões do genoma responsáveis pela expressão do caráter peso de panícula em aveia.

Referências

- CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA, J.F.; FLOSS, E.L. FERREIRA-FILHO, A.W.; FRANCO, F.A.; FEDERIZZI, L.C.; NODARI, R.O. Potencial genético da aveia como produtora de grãos no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.71-82, 1987.
- CHAPKO, L.B.; BRINKMAN, M.A. Interrelationships between panicle weight, grain yield on grain yield components in oat. **Crop Science**, Madison, v.31, p.878-882, 1991.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Editora UFV, 2001, 648p.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In. ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1987.
- FLOSS, E.L.; JASTER, F.; GORA, A.; WOBETO, C.; ALMEIDA, J.L. **Desempenho da Cultura de Aveia e Evolução do Experimento em Entre Rios**, Guarapuava, Paraná, 1989, 56p.
- FREY, K.J. The utility of hill plots in oat research. **Euphytica**, Wageningen, v.14, p.196-208, 1965.

GRAVOIS, K.A.; MCNEW, R.W. Genetic relationships among and selection for rice yield and yield components. **Crop Science**, Madison, v.33, p. 249-252, 1993.

MCNEAL, F.H.; QUALSET, C.O.; BALDRIDGE, G. et al. Selection for yield and yield components in wheat. **Crop Science**, Madison, v.18, p.795-799, 1978.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. 1991. Identification of markers to disease-resistance genes by bulked segregant analyses: a rapid method detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V.88, p.9828-9832, 1991.

SAMPSON, D.R. Additive and non additive genetic variances and genotype correlations for yield and other traits in oats. **Canadian Journal Genetics Cytology**, Ottawa, v.13, p.864-872, 1971.

VALENTINE, J. Early generation selection for yield in cereals. In: LANGE, W. Efficiency in plant breeding. **Proceedings of 10th European Congress of Resources Plant Breeding. Wageningen**, 19-24, 1983. Eucarpia, Wageningen. Eucarpia, Wageningen, 1983.

VIEIRA, A.L.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; BENIN, G.; ZIMMER, P.D.; SILVA, J.A.G.; MARTINS, A.F.; BERTAN, I.; SILVA, G.O.; SCHMIDT, D.A.M. Comparação entre medidas de distância genealógica, morfológica e molecular em aveia em experimentos com e sem a aplicação de fungicida. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.1, p.51-60, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. London, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

Recebido em: 13/10/2009

Aceito para publicação em: 01/02/2010