

Diversidade Genética de Milho-Doce Utilizando Marcadores Microsatélites

Marcos de Oliveira Pinto⁽¹⁾; Flavia França Teixeira⁽²⁾; Claudia Teixeira Guimarães⁽²⁾.

⁽¹⁾ Analista de pesquisa e desenvolvimento; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG, marcos.deoliveira@embrapa.br;

⁽²⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG.

RESUMO: O conhecimento da diversidade genética de uma cultura é uma poderosa ferramenta para os programas de melhoramento. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de 37 genótipos de milho-doce que representam os principais materiais disponíveis no Banco de Gemoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, além de cultivares comerciais. Um total de 24 marcadores microsatélites, distribuídos ao longo do genoma geraram 212 alelos que foram utilizados para calcular o índice de dissimilaridade genética, como o complemento do coeficiente de Dice. Os agrupamentos foram realizados pelo método hierárquico UPGMA e pela análise de componentes principais. O valor de PIC médio foi 0,75, variando de 0,4, para o loco bnlg155, a 0,91, para os locos dupSSR24 e bnlg161. O valor de dissimilaridade genética variou de 0,13 a 0,74 mostrando uma ampla variabilidade genética entre os genótipos de milho-doce. A análise da diversidade genética evidenciou que a origem foi o fator mais preponderante do agrupamento tendo como base a similaridade genética. Adicionalmente, verificou-se a existência de variabilidade genética disponível dentro do Banco de Germoplasma que pode ser utilizada para o desenvolvimento de novos materiais.

Termos de indexação: *Zea mays* L.; Marcadores moleculares e SSR.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho-doce é uma hortaliça voltada para o processamento industrial, sendo ainda pouco difundido para o consumo "in natura" pelo restrito número de cultivares adaptadas ao clima tropical (Kwiatkowski & Clemente, 2007), sendo que o número de variedades disponíveis em coleções elites e bancos de germoplasma é muito reduzido quando comparado ao milho comum (Teixeira, 2013). De acordo com o registro de cultivares do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento,

em 2016 apenas 58 cultivares de milho-doce foram recomendadas por dez diferentes empresas, sendo que poucas apresentam potencial de serem realmente cultivadas.

O estudo de diversidade genética, principalmente utilizando-se marcadores moleculares, é uma ferramenta muito importante para a caracterização e utilização do germoplasma nos programas de melhoramento. Além disso, permite que empresas, públicas e privadas, realizem introgresões de novos materiais para ampliar a base genética dos seus programas.

Os microsatélites (SSR) estão entre os principais marcadores moleculares utilizados na caracterização de linhagens de milho em programas de melhoramento e de acessos em vários países, como Índia (Sharma et al., 2010), Canadá (Reid et al., 2011) e Brasil (Eloi et al., 2012).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de 37 genótipos de milho-doce que representam os principais materiais disponíveis no Banco de Gemoplasma mantido na Embrapa Milho e Sorgo além de cultivares comerciais, para auxiliar o programa de melhoramento de milho-doce da Embrapa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Foram utilizados 37 genótipos de milho-doce, que podem ser classificados nos seguintes três grupos de acordo com a sua origem, sendo 19 retirados no BAG Milho que são em sua maioria cultivares comerciais antigas, sete cultivares híbridos comerciais recentes e 11 introduzidos dos EUA no Brasil em 2009 para fins de melhoramento e que por essa razão podem ser classificados como germoplasma de origem temperada (**Tabela 1**).

Extração de DNA, amplificação dos SSR e eletroforese

Para a extração do DNA genômico foi feito uma

amostragem de discos foliares de oito plantas individuais para representar cada genótipo. A extração foi realizada em placas de 96 poços utilizando o aparelho GenoGrinder 2000 (Spex, NJ, EUA), segundo Lana et al. (2010).

Tabela 1 - Genótipos de milho-doce utilizados no estudo de diversidade genética.

| Nº | Genótipo |
|----|-----------------------------------------------------------------------|
| 1 | Doce do Hawai – BAG |
| 2 | Doce UNB 1 – BAG |
| 3 | Tuc Blanco Dulce EEAOC – BAG |
| 4 | Splendor – Comercial |
| 5 | PI 503577 Z20-010 – Intr. para melhoramento |
| 6 | Doce Cubano – BAG |
| 7 | Milho-doce 2 – BAG |
| 8 | MG 161 – Branco Doce – BAG |
| 9 | Sh MS EX 03411227 – Comercial |
| 10 | PI 608778 – B86 – Intr. para melhoramento |
| 11 | Doce Opaco – BAG |
| 12 | BR 400 - Superdoce – BAG |
| 13 | MG 162 - Amarelo Doce – BAG |
| 14 | SWB 551 – Comercial |
| 15 | PI 644099 – Florida 56 – Intr. para melhoramento |
| 16 | Doce Flor da Serra – BAG |
| 17 | BR 401 – Doce de ouro – BAG |
| 18 | Doce da Flórida – BAG |
| 19 | DO 04 – Intr. para melhoramento |
| 20 | PI 644100 – Florida 32 – Intr. para melhoramento |
| 21 | BR 402 – Doce Cristal – BAG |
| 22 | Doce Sofia – Comercial |
| 23 | AMES 15667- Country Dakota Yellow – Intr. para melhoramento |
| 24 | NSL 4640 Hawaiian Sugar – Intr. para melhoramento. |
| 25 | PR 030 Doce Flor da Serra 51 – BAG |
| 26 | BR 427 III – BAG |
| 27 | Doce Elisa – Comercial |
| 28 | NSL 179257 – Sweet Corn – Intr. para melhoramento |
| 29 | PI 612343-SHRUNKEN Zapalote chico – Intr. para melhoramento |
| 30 | CMS 27 III Doce Hawai – BAG |
| 31 | CNPH 1 – BAG |
| 32 | BRS Vivi – Comercial |
| 33 | PI 269756–North Dakota Yellow Sweet – Intr. para melhoramento |
| 34 | Milho-doce 1 UNB – BAG |
| 35 | TEEA Dulce EEAOC – BAG |
| 36 | Tropical Plus – Comercial |
| 37 | PI 451692 – Cargill North Temp. Zone Coroico –intr. para melhoramento |

A genotipagem foi realizada com bases em 24

iniciadores SSR marcados com fluorocromos e amplamente distribuídos ao longo do genoma. As reações de amplificação foram realizadas utilizando 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada iniciador e Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA, EUA), conforme recomendações do fabricante. As reações de PCR foram realizadas em *touchdown*: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 7 ciclos de 94 °C por 20 s, 60 °C (com redução de 1 °C por ciclo até 53 °C) por 1 min e 72 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 53 °C por 1 min e 72 °C por 1 min; extensão final de 72 °C por 5 min. Os fragmentos gerados foram analisados no sequenciador automático Mega Bace 1000 (GE Healthcare Life Science, SP, Brasil).

Análises de dados moleculares

O índice de dissimilaridade genética foi estimado a partir do complemento do coeficiente de Dice. O dendrograma foi obtido a partir da matriz de dissimilaridade pelo método de agrupamento UPGMA. Adicionalmente foi realizada a análise de componentes principais. As análises dos dados moleculares foram realizadas empregando-se o programa Genes (Cruz, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos 24 locos SSR foi possível obter a amplificação de 212 alelos, o número de alelos amplificados variou de 2 (umc1139) a 21 (bnlg125), tendo como média 8,75 alelos por loco. O PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) médio foi 0,75, variando de 0,4, para o loco bnlg155 a 0,91, para os locos dupSSR24 e bnlg161, a (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Número de alelos amplificados e PIC dos 24 locos SSR amplificados.

| SSR | *Bin | Nº de alelos amplificados | PIC |
|-----------|------|---------------------------|------|
| umc1222 | 1,01 | 14 | 0,85 |
| umc1862 | 1,11 | 9 | 0,77 |
| bnlg125 | 2,02 | 21 | 0,89 |
| phi109642 | 2,04 | 3 | 0,58 |
| dupssr24 | 2,08 | 19 | 0,91 |
| phi374118 | 3,02 | 7 | 0,74 |
| phi053 | 3,05 | 8 | 0,75 |
| umc1489 | 3,07 | 4 | 0,68 |
| umc1759 | 4,01 | 9 | 0,75 |
| phi093 | 4,08 | 3 | 0,66 |
| umc1056 | 5,03 | 8 | 0,79 |
| bnlg161 | 5,05 | 20 | 0,91 |
| umc1887 | 6,03 | 5 | 0,73 |
| mmc0241 | 6,05 | 10 | 0,81 |
| bnlg155 | 7,03 | 5 | 0,40 |
| umc1139 | 8,01 | 2 | 0,52 |
| umc2146 | 8,03 | 4 | 0,58 |

| | | | |
|----------|-------|----|------|
| dupSSR14 | 8,09 | 10 | 0,87 |
| phi028 | 9,01 | 5 | 0,74 |
| umc1033 | 9,02 | 15 | 0,87 |
| umc1771 | 9,04 | 6 | 0,74 |
| umc1366 | 9,06 | 5 | 0,72 |
| phi041 | 10,00 | 6 | 0,81 |
| umc1084 | 10,07 | 12 | 0,82 |

*Bin – Posição do marcador ao longo dos cromossomos.

As medidas de dissimilaridades obtidas ficaram entre 0,13 e 0,74, indicando uma ampla variação no coeficiente e alta diversidade ente os genótipos de milho-doce avaliados.

A dispersão dos genótipos de milho-doce foi avaliada com base no dendograma gerado pelo método hierárquico UPGMA (**Figura 1**) e pela análise de componentes principais (**Figura 2**). A partir dessas análises foi possível verificar que os genótipos de milho-doce da Embrapa ficam dispersos em três agrupamentos principais. O primeiro agrupamento, disposto na base da **Figura 1**, é composto de apenas um genótipo, denominado PI 612343 *shrunken Zapalote Chico* que trata-se de uma introdução recente dos Estados Unidos da América no Brasil com a finalidade de melhoramento. Esse genótipo é derivado da raça Zapalote Chico de origem mexicana (Widstrom et al, 2003). Possivelmente, a maior distancia genética entre esse genótipo e os demais se deva justamente ao uso da raça local Zapalote Chico na obtenção da população, uma vez que os demais acessos são derivados, possivelmente de coleções elite de programas de melhoramto. O segundo agrupamento, engloba os seguintes genótipos de origem norte americana: PI 644099 - Flórida 56, Doce Flórida, PI 644100 – Flórida 32, Ames 15667 – *Country Dakota Yellow*, NSL 179257 – *Sweet Corn* e PI 269756 – *North Dakota Yellow Sweet* que mostraram ter como ponto em comum a origem, pois a maioria dos integrantes deste *agrupamento* têm referência aos estados da Flórida e de Dakota do Norte. Os demais acessos foram reunidos no mesmo agrupamento que engloba 30 dos 37 genótipos avaliados. Nesse agrupamento, também estão genótipos de origem em comum, pois neles foram incluídos todos os genótipos comerciais do Brasil, todos os acessos do banco de germoplasma, exceto do Doce da Flórida, e parte dos genótipos introduzidos recentemente no Brasil para fins de melhoramento. Esse resultado era esperado tendo em vista que os genótipos do banco de germoplasma são em sua maioria introduções originárias de programas de melhoramento brasileiros e estrangeiros.

A apresentação gráfica da análise de

componentes principais (**Figura 2**) confirma esses resultados uma vez que os acessos pertencentes aos dois primeiros *agrupamentos* da **Figura 1** mantiveram-se agrupados quando se empregou a metodologia de componentes principais. Na **Figura 2**, pode ser observado também a similaridade entre os acessos BR 427 III, BR 401 - Doce de Ouro, CNPH 1, Doce do Hawaii e CMS 27 III, o que era esperado pois a maioria desses genótipos está relacionado com o programa de melhoramento de milho-doce conjunto entre as Embrapa Milho e Sorgo e Embrapa Hortaliças desenvolvido nos anos de 1980 (Teixeira et al., 2013).

O melhoramento de milho-comum no Brasil está estruturado para a exploração de grupos heteróticos baseados nos tipos de grãos duro e dentado (Parentoni et al., 2001). Essa classificação não pode ser estendida para o milho-doce, justamente devido ao tipo de grão. Assim, informações sobre a divergência genética entre genótipo de milho-doce permitem a identificação de acessos com maior potencial de heterozigosidade e que poderá estar associada a maior heterose. Os resultados obtidos mostraram potencial para o uso de genótipos de outras raças para ampliar a divergência no conjunto gênico do milho-doce, entretanto a escolha desses genitores deverá ser criteriosa tendo em vista que outros caracteres relacionados à qualidade de grãos e espigas devem ser considerados no melhoramento do milho-doce (Teixeira et al, 2013).

CONCLUSÕES

A análise da diversidade genética entre genótipos de milho-doce evidencia que a origem dos genótipos foi o fator mais preponderante para a formação dos agrupamentos tendo como base a similaridade genética.

Adicionalmente, é verificada a existência de variabilidade genética disponível dentro do Banco de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo que poderá ser utilizada para o desenvolvimento de novos materiais.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Milho e Sorgo e à FAPEMIG pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

CRUZ, C. D. GENES: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, p. 271-276, 2013.

ELOI, I. B. O.; MANGOLIN, C. A.; SCAPIM, C. A., GONÇALVES, C. S.; MACHADO, M. F. P. S. Selection of high heterozygosity popcorn varieties in Brazil based on SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 1851-1860, 2012.

KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Characteristics of sweet corn (*Zea mays* L.) for industrialization. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, n. 2 p. 93-103, 2007.

PARENTONI, S. N.; MAGALHÃES, J. V.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; ABADIE, T.; GAMA, E. E. G.; GUIMARÃES, P. E. O.; MEIRELLES, W. F.; LOPES, M. A.; VASCONCELOS, M. J. V.; PAIVA, E. Heterotic groups based on yield-specific combining ability data and phylogenetic relationship by RAPD markers for 28 tropical maize open pollinated varieties. **Euphytica**, v. 121, p. 197-208, 2001.

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. de; OLIVEIRA, B. C. F. S **Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104).

REID, L. M.; XIANG, K.; ZHU, X.; BAUM, B. R.; MOLNAR, S. J. Genetic diversity analysis of 119 Canadian maize inbred lines based on pedigree and simple sequence repeat markers, **Canadian Journal of Plant Science**, v. 91, p. 651-661, 2011.

SHARMA, L.; PRASANNA, B. M.; RAMESH, B. Phenotypic and microsatellite-based diversity and population genetic structure of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region, **Genetica**, v. 138, p. 619–631, 2010.

TEIXEIRA, F. F.; MIRANDA, R. A.; PAES, M. C. D.; SOUZA, S. M.; GAMA, E. E. G. **Melhoramento do milho doce**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 32 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 154)

WIDSTROM, N. W.; WISEMAN, B. R.; SNOOK, M. E.; NUSSLY, G. S.; SCULLY, B. T. Registration of the Maize Population Zapalote Chico 2451F. **Crop Sci.**, v. 42, p. 444-445, 2003.

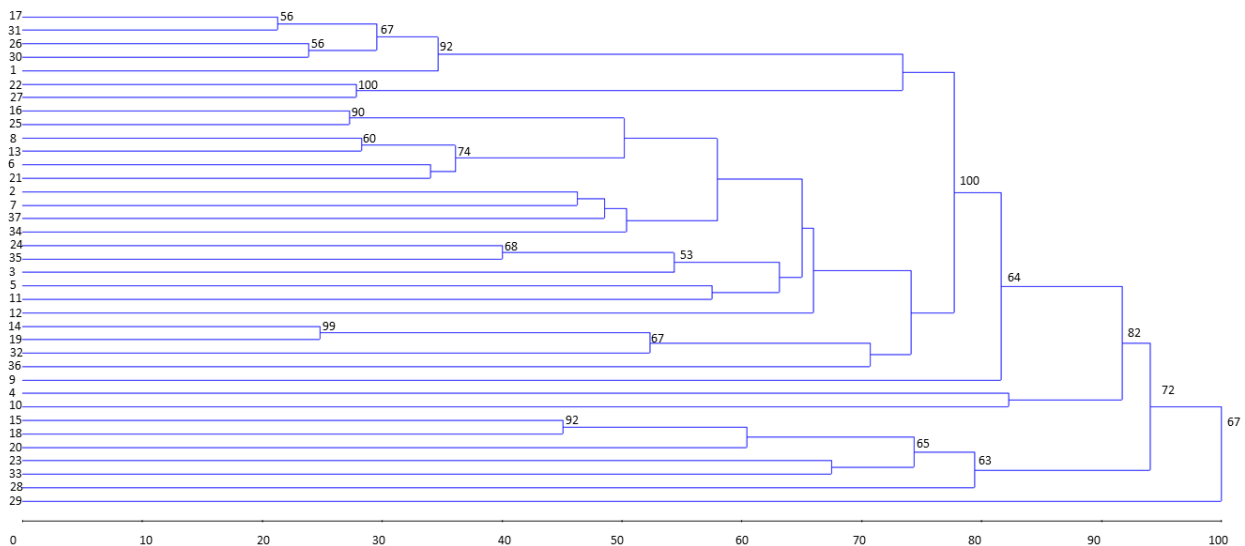


Figura 1: Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade entre genótipos de milho-doce. Os valores a cima de cada ramo representam o *bootstrap*. Genótipos numerados de acordo com a **Tabela 1**.

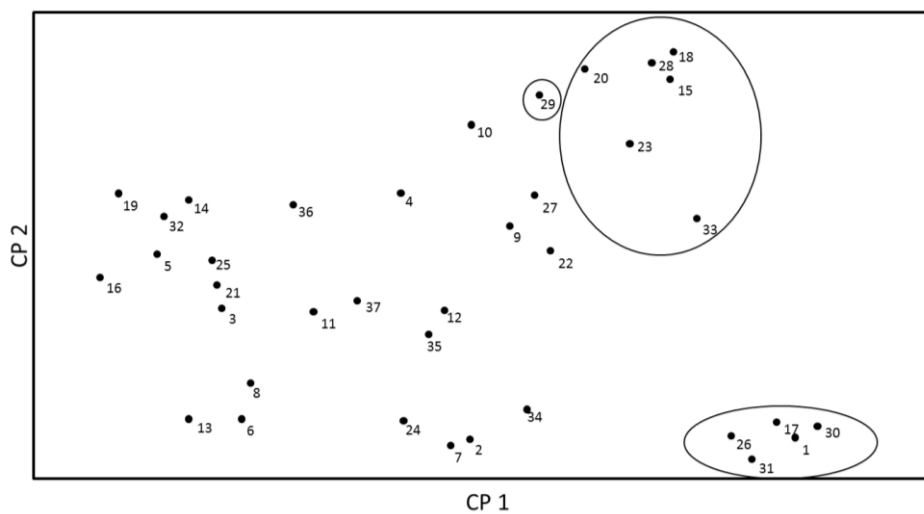


Figura 2: Análise de componentes principais dos genótipos de milho-doce com base na diversidade genética. Genótipos numerados de acordo com a **Tabela 1**.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

**"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"**
