

Análise da diversidade genética de linhagens de milho tropicais e temperadas por meio de marcadores microssatélites

Hayssa Vilela Santos⁽¹⁾; Vania Portes Kulka⁽²⁾; Omar Possatto Junior⁽³⁾; Mauricio Carlos Kuki⁽³⁾; Evandrei Santos Rossi⁽³⁾; Maria Fernanda de Souza Dias⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Estudante de Mestrado; Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento - Universidade Estadual de Maringá; Maringá; hayssa.vilela@hotmail.com; ⁽²⁾ Pesquisador na empresa KWS SAAT AG; ⁽³⁾ Estudante de Doutorado; Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento - Universidade Estadual de Maringá; Maringá, Paraná.

RESUMO: Os programas de melhoramento de milho baseiam-se no desenvolvimento de híbridos a partir de linhagens com elevado grau de homozigose, explorando assim, o efeito da heterose. Os marcadores moleculares SSR podem ser utilizados em programas de melhoramento como uma ferramenta para estimar a diversidade genética, identificar diferentes grupos heteróticos e alocar novas linhagens nesses grupos. O objetivo foi estimar a diversidade genética e identificar grupos heteróticos entre dois grupos de linhagens de milho por meio de marcadores moleculares (SSR). A extração do DNA das linhagens e as análises moleculares foram realizadas no laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual de Maringá. Com base na distância de Nei e na análise de agrupamentos pelo método UPGMA, as linhagens foram classificadas em sete grupos heteróticos distintos, sendo eles: Grupo 1 - Linhagens tropicais L4 (Sintético Pioneer 1), L5 (Sintético Pioneer 2), L7 (Sintético Embrapa 1) e a linhagem temperada L6 (PHG39). Grupo 2 - Linhagens tropicais L1, L2 e L3 (Sintético Cargill 1, 2 e 3 respectivamente). Grupo 3 - Linhagem tropical L6 (Sintético Pioneer) e a linhagem temperada L3 (LH82). Grupo 4 - Linhagem temperada L1 (B73). Grupo 5 - Linhagem temperada L4 (LH123) e L7 (PHV78). Grupo 6 - Linhagem L5 (PH207) e Grupo 7 - Linhagem L2 (Mo 17). O emprego de marcadores moleculares SSR foi eficiente para avaliar a diversidade genética e determinar grupos heteróticos.

Termos de indexação: *Zea mays* L., grupo heterótico, distância genética.

INTRODUÇÃO

Os programas de melhoramento de milho são baseados no desenvolvimento e seleção de híbridos a partir de linhas puras. A heterose, conceito

introduzido após os estudos de Shull, é a base do melhoramento genético de milho híbrido (Melchinger et al., 1990). A identificação de grupos heteróticos é extremamente importante dentro de um programa de melhoramento de milho híbrido, pois identifica grupos de germoplasma e posiciona linhagens e populações em grupos que apresentam resposta heterótica similar (Orman & Smith, 1988).

Os grupos heteróticos tem um forte impacto no melhoramento das culturas, por determinar em grande parte o tipo de germoplasma usado nos programas de pesquisa durante um longo período de tempo (Reif et al., 2005). Como a divergência genética pode estar associada à heterose, as análises de divergência genética podem ser úteis para a predição preliminar de cruzamentos que otimizem a heterose.

Desde a década de 1980 os marcadores moleculares tornaram-se frequentes em estudos genéticos nos programas de melhoramento, havendo uma mudança na forma de seleção que era realizada apenas no fenótipo, para seleção feita também com base no genótipo (Simko, 2009). Os marcadores moleculares SSR podem ser utilizados como uma ferramenta útil para agrupar germoplasma, complementando os experimentos de campo na identificação de grupos geneticamente similares (Reif et al., 2003).

Inúmeros trabalhos foram desenvolvidos utilizando materiais temperados com objetivo de estudar a diversidade genética existente e separá-los em grupos heteróticos por meio de marcadores moleculares (Liu et al., 2003; Mikel, 2006; Nelson et al., 2008), evidenciando a eficácia desta metodologia em programas de melhoramento.

O presente trabalho teve como objetivo estimar a divergência genética, por meio de marcadores SSR, entre sete linhagens tropicais e sete linhagens temperadas, e com base nestas distâncias, agrupá-las em diferentes grupos heteróticos.

MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens tropicais utilizadas no trabalho pertencem ao banco de germoplasma da KWS Melhoramento e Sementes Ltda. As linhagens temperadas são oriundas dos Estados Unidos, após a expiração de seus certificados de proteção. As linhagens utilizadas no trabalho estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 – Características das 14 linhagens de milho pertencentes ao banco de germoplasma da KWS Melhoramento e Sementes Ltda.

Linhagem	Origem	Tipo de grão
Grupo I - Linhagens Tropicais		
L01	Sint. Cargill 1	Duro
L02	Sint. Cargill 2	Duro
L03	Sint. Cargill 3	Semi Duro
L04	Sint. Pioneer 1	Duro
L05	Sint. Pioneer 2	Semi Duro
L06	Sint. Pioneer 3	Semi Dentado
L07	Sint. Embrapa 1	Semi Duro
Grupo II - Linhagens Temperadas		
B73 (L1')	StiffStalkSintetic	Semi Dentado
MO17 (L2')	Lancaster	Dentado
LH82 (L3')	Derivado de híbrido comercial	Dentado/Semi Dentado
LH123 (L4')	Derivado de híbrido comercial	Semi Dentado
PH207 (L5')	Iodent	Dentado
PHG39 (L6')	Maiz Amargo	Semi Dentado
PHV78 (L7')	Oh07 – Midland	Dentado

Extração do DNA

Foram coletadas folhas jovens de 5 plantas de cada linhagem, sendo feitas as análises individuais de cada planta. O DNA genômico foi isolado de acordo com a metodologia de Hoisington et al., (1994), com pequenas modificações. O DNA extraído foi armazenado a 4°C.

Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada utilizando-se o equipamento Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer. Após a quantificação em cada amostra, realizou-se a diluição, do DNA para a concentração de 10ng/μL (amostra de trabalho).

Amplificação do DNA

Para a escolha dos marcadores polimórficos, foram avaliados 74 microssatélites já mapeados em milho comum. Todos os microssatélites analisados foram obtidos a partir do site Maize DB acessado

em <http://www.maizegdb.org/ssr.php>.

A PCR (Polimerase Chain Reaction) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, usando um termociclador Techne TC-512. Para a amplificação do DNA e seleção de primers, foram utilizados: 25 ng de DNA de três amostras, com 2,0 μl de tampão de reação 10X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 μM de cada dNTP, 1 U de Taq-DNA Polimerase (Invitrogen), e 0,4 μM de primers Forward e Reverse específicos para volume final de 20 μl.

A seleção dos microssatélites foi feita utilizando-se quatro amostras de DNA, escolhidas ao acaso e analisadas em gel de agarose Metaphor ou MS-8 para verificar a complementaridade e reprodutibilidade dos primers. A amplificação dos microssatélites foi feita com o auxílio do programa Touchdown PCR. Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 4%, usando 50% de agarose comum e 50% agarose Metaphor. A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 60 volts durante cerca de 4 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução com brometo de etídio, contendo 0,5 μg/mL ou SYBR® Safe DNA gel stain, e a imagem capturada com Ultraviolet Transiluminador High Performance – Edas 290, utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

Análise dos dados moleculares

Visando analisar a diversidade genética nas linhagens de milho, cada fragmento de DNA amplificado e identificado como uma banda no gel foi considerado um fenótipo distinto e independente dos demais, determinando os alelos de cada loco SSR.

A distância genética entre os acessos avaliados foi estimada pela distância de Nei (1972) e calculada com o auxílio do programa GenAlEx 6.1 (Peakall & Smouse, 2006)

A partir das distâncias genéticas de Nei, foi elaborado um dendrograma utilizando a análise de agrupamento (cluster) UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average), utilizando o programa Mega 5.05 (Tamura et al., 2011).

Para avaliar o uso do método de agrupamento, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (Rohlf & Sokal, 1981). Para obtenção deste coeficiente, calculou-se a correlação linear de Pearson entre os elementos da matriz de dissimilaridade (matriz de distâncias entre as cultivares, obtida a partir dos dados originais) e os elementos da matriz cofenética (matriz de distâncias

entre as cultivares, obtida a partir do dendrograma).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização molecular das linhagens

Dos 74 primers testados, 4 não amplificaram nos 14 genótipos de milho. Dos 70 pares de primers microssatélites, 27 foram considerados polimórficos para os 14 genótipos e, sendo utilizados 22 desses pares de primers para estudar a variabilidade genética. Os 22 primers analisados foram escolhidos aleatoriamente. No entanto, encontraram-se distribuídos nos dez cromossomos em 22 “bins” no genoma do milho. Destes 22 primers utilizados para a análise dos 22 locos SSR, nove apresentaram dois alelos, três apresentaram 6 alelos, seis apresentaram quatro alelos e apenas um apresentou 5 alelos.

Para a análise de agrupamento das linhagens foram utilizados os dados de diversidade genética obtidos por marcadores moleculares microssatélites (SSR). A análise das medidas de distância genética se encontra Tabela 1.

Tabela 1 – Matriz de distância de Nei (1972) obtida com dados da avaliação de microssatélites para os 14 genótipos de milho.

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L1'	L2'	L3'	L4'	L5'	L6'	L7'
L1	0.000													
L2	0.571	0.000												
L3	0.563	0.536	0.000											
L4	0.594	0.956	0.584	0.000										
L5	0.611	1.086	0.807	0.526	0.000									
L6	1.061	1.024	0.815	0.904	0.605	0.000								
L7	0.537	0.925	0.720	0.668	0.503	0.804	0.000							
L1'	1.060	1.344	0.631	0.746	0.766	0.882	0.842	0.000						
L2'	1.300	1.849	1.075	0.741	1.097	1.152	0.982	1.075	0.000					
L3'	0.897	0.959	0.884	1.002	1.040	0.622	0.658	0.808	1.242	0.000				
L4'	1.167	1.185	1.181	0.885	0.885	1.303	0.519	0.845	1.096	0.728	0.000			
L5'	1.347	0.885	0.989	0.894	1.299	0.794	1.649	1.123	0.964	1.002	1.236	0.000		
L6'	0.632	1.024	0.687	0.482	0.700	0.637	0.553	0.797	1.135	0.543	0.820	1.230	0.000	
L7'	0.918	1.086	0.965	0.693	0.894	1.333	0.761	0.708	0.741	1.290	0.511	0.788	0.672	0.000

Com base na matriz de distância obtida, detectaram-se maiores distâncias genéticas entre as linhagens L2 x L2' (1,849) e L7 x L5' (1,649) e as menores distâncias entre as linhagens L4 x L6' (0,482) e L7 x L4 (0,519), com distância média entre as linhagens de 0,957.

A partir das análises de agrupamento pelo método UPGMA foi possível a construção de um dendrograma, pode-se observar a divisão das linhagens em sete grupos (Figura 1).

No grupo 1 foram alocadas as linhagens tropicais L4 (Sintético Pioneer 1), L5 (Sintético Pioneer 2) e L7 (Sintético Embrapa 1) e a linhagem temperada L6' (PHG39). A linhagem PHG39, pertencente ao

grupo heterótico “Maiz Amargo Argentino”, foi introduzida no banco genético da Pioneer, nos Estados Unidos, em 1980, dando início à criação de um germoplasma exclusivo dentro da empresa (Smith et al., 2004). O provável uso deste germoplasma na composição de híbridos explorados comercialmente no Brasil explica o fato das linhagens L4, L5 e L6' terem sido alocadas dentro do mesmo grupo heterótico nesse estudo (Figura 1). No grupo 2 foram alocadas as linhagens tropicais L1, L2 e L3 (Sintético Cargill 1, 2 e 3, respectivamente). Neste estudo não foi associada nenhuma linhagem temperada no mesmo grupo. Indicando que tais linhagens formam um grupo heterótico específico dentro do germoplasma (Figura 1).

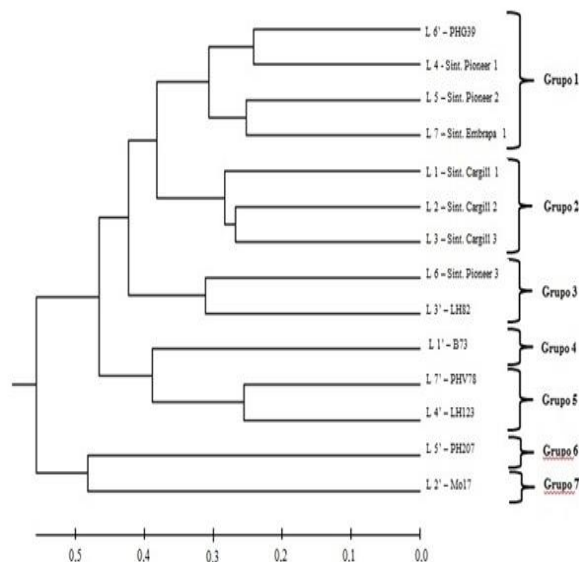


Figura 1 – Análise de agrupamento pelo método UPGMA de 14 linhagens de milho, com base na matriz de distância genética obtida a partir de dados moleculares.

No grupo 3 foi incluída a linhagem tropical L6 (Sintético Pioneer 3) e a linhagem temperada L3' (LH82). A linhagem LH82 foi obtida por meio de autofecundação do híbrido Pioneer 3558. Esta linhagem manteve sua integridade por recombinação dentro do próprio grupo, sendo considerada “uma família por si só”, dada a sua composição genética (Mikel & Dudley, 2006) (Figura 1).

No grupo 4 foi alocada apenas a linhagem temperada L1' (B73) A linhagem Stiff Stalk B73 desempenha papel dominante na composição genética do germoplasma comercial americano até os dias de hoje (Figura 1).

No grupo 5 foram alocadas apenas linhagens temperadas, sendo elas L4' (LH123) e L7' (PHV78) (Figura1). A linhagem LH123 também é considerada uma família por si só (Mikel & Dudley, 2006). Pertence ao grupo das linhagens Não Stiff Stalk (Mikel, 2006; 2008). A linhagem PHV78, pertence ao grupo Oh07-Midland, é derivada da linhagem Pioneer PH595 considerada como Não Stiff Stalk e Não Iodent, não havendo informações se a mesma contém alguma relação com o grupo Lancaster.

No grupo 6 foi incluída a linhagem temperada L5' (PH207), pertencente ao grupo das linhagens Não-Stiff Stalk (Mikel, 2006; 2008).

No grupo 7 foi incluída a linhagem temperada L2' (Mol 17), pertencente ao grupo Lancaster, sendo sua fundadora e maior representante até o momento (Mikel, 2006; 2008).

O coeficiente de correlação cofenética ($r = 0,64$) indicou concordância entre os valores de distância genética e, desta forma a confiabilidade do dendrograma. Resultado semelhante foi obtido por Xia et al. (2004), que estudando a diversidade genética de linhagens tropicais obteve valores de coeficiente de correlação cofenética de 0,63 para genótipos de grão branco e 0,67 para genótipos de grão amarelo.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram parcialmente com aqueles obtidos por Nelson et. al (2008), que estudando a diversidade genética de um grupo de 92 linhagens temperadas, incluindo as 7 linhagens presentes nesse estudo, por meio de marcadores moleculares SNP, separaram cada uma destas linhagens em um grupo distinto.

CONCLUSÕES

As linhagens tropicais e temperadas foram alocadas em sete possíveis grupos heteróticos.

REFERÊNCIAS

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: CIMMYT. **Applied Molecular Genetics Laboratory**, Mexico, D.F.: CIMMYT, 1994. 50p

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 Microsatellites. **Genetics**, 165: 2117-2128, 2003

MELCHINGER, A.E.; LEE, M.; LAMKEY, K.R. AND WOODMAN, W.L. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimated genetic effects in maize inbreds. **Crop Science**, 30: 1033-1040, 1990.

MIKEL, M. A. Availability and Analysis of Proprietary Dent Corn Inbred Lines with Expired U.S. Plant Variety Protection. **Crop Science**, 46:2555–2560, 2006.

MIKEL, M.A. e DUDLEY, J. W. Evolution of North American Dent Corn from Public to Proprietary Germplasm. **Crop Science**, 46: 1193–1205, 2006.

MIKEL, A. Genetic Diversity and Improvement of Contemporary Proprietary North American Dent Corn. **Crop Science**, 48: 1686-1695, 2008.

NEI, M. Genetic distance between population. **The American Naturalist**, 106: 83-292, 1972.

NELSON, P. T.; COLES, N. D.; HOLLAND, J. B.; BUBECK, D. M.; SMITH, S.; GOODMAN, M. Molecular Characterization of Maize Inbreds With Expired U. S.. Plant Variety Protection. **Crop Science**, 48: 1673-1685, 2008.

ORMAN, B. A.; SMITH, J.S. C. Use of Biochemical Gene Markers for Measuring Maize Genetic Diversity. In: N. Russell and G. M. Listman (Eds.), **Recent advances in the conservation and utilization of genetic resources: Proceedings of the global maize germplasm workshop**. CYMMIT, El Batán, México. 6 a 12 de março de 1988.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, 6: 288-295. 2006.

REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C.; WARBURTON, M. L., D. A.; HOISINGTON, S. K. VASAL; SRINIVASAN, G.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic Distance Based on Simple Sequence Repeats and Heterosis in Tropical Maize Populations. **Crop Science**, 43: 1275-1282, 2003.

REIF, J.C.; HALLAUER, A.R; MELCHINGER A.E. Heterosis and heterotic patterns in maize. **Maydica**, 50: 215-223, 2005.

ROHLF, F.J.; SOKAL, R.R. Comparing numerical taxonomic studies. **Systematic Zoology**, 30:459-490, 1981.

SMITH, J. S. C.; DUVICK, D. N.; SMITH, O. S.; COOPER M.; FENG L. Changes in Pedigree Backgrounds of Pioneer Brand Maize Hybrids Widely Grown from 1930 to 1999. **Crop Science**, 44: 1935-1946, 2004.

SIMKO, I. Development of EST-SSR Markers for the Study of Population Structure in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Heredity**, 100(2): 256–262, 2009.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum



Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

XIA, X. C.; REIF, J. C.; HOISINGTON, D. A.; MELCHINGER, A. E.; FRISCH, M.; WARBURTON, M. L. Genetic Diversity among CIMMYT Maize Inbred Lines Investigated with SSR Markers: I. Lowland Tropical Maize. **Crop Science**, 44: 2230-2237, 2004.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

“Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar”
